

R. 18640889.

R. 2782²³²

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

ESTUDIOS QUIMICO - ANALITICOS PARA LA DETERMINACION
DE BIGUANIDAS EN PREPARADOS FARMACEUTICOS



MEMORIA que para aspirar al
grado de Doctor presenta:

PILAR CAMPINS FALCO

Valencia 1985

UMI Number: U603117

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603117

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

FACULTAD QUIMICA
BIBLIOTECA

Cat.

Encuad.

Ent. 2782-Q

Mat. 615.05

Sell.

Test.

Top. T.D-Q
205

A mis padres

A mi marido

JOSE MARTINEZ CALATAYUD, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

Que la presente Memoria "Estudios Químicos - Analíticos para la determinación de Biguanidas en preparados farmacéuticos " constituye la Tesis Doctoral de D^a PILAR CAMPINS FALCO.

Así mismo, certifica haber dirigido tanto los diferentes aspectos del trabajo como la redacción de la presente Memoria.

Para que así conste, firmo la presente en Valencia a 28 de Mayo de 1985

Fdo. José Martínez Calatayud

Quiero hacer constar mi agradecimiento al Profesor Dr. JOSE MARTINEZ CALATAYUD por la dirección del presente trabajo. A Dr. M^ª CARMEN PABQUAL MARTI por su colaboración y ayuda.

Así mismo quiero agradecer a todos mis compañeros de Departamento su aliento y eficaz ayuda , y en especial a D^ª DOLORES SOLER.

GUIÓN

I.- INTRODUCCION

I.1.- ANTECEDENTES

I.1.1.- Biguanidas	5
I.1.2.- Valoraciones conductimétricas en el análisis de medicamentos	32
I.1.3.- Estudio de las transiciones de color de indicadores visuales de punto final	35
I.1.4.- Analisis por inyección en flujo de medicamentos	47

I.2.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO	56
--------------------------------------	----

II.- PARTE EXPERIMENTAL

INDICE DE TABLAS	60
------------------------	----

INDICE DE FIGURAS	67
-------------------------	----

II.1.- REACTIVOS Y APARATOS	73
-----------------------------------	----

II.2.- SISTEMAS Cu(II) - BIGUANIDA

II.2.1.- Constantes de acidez de la 2-sulfoetilbiguanida.....	77
II.2.1.1.- Método espectrofotométrico....	80
II.2.1.2.- Método potenciométrico	86
II.2.2.- K_{ps} de Cu(II) - 2-sulfoetilbiguanida	93

II.2.3.- Valoraciones conductimétricas de biguanidas en productos farmaceuticos	
II.2.3.1.- Ensayos previos	99
II.2.3.2.- Influencia del medio	102
a).- Complejos sólidos	
b).- Complejos solubles	
II.2.3.3.- Influencia de la concentración de reactivos	138
a).- Complejos sólidos	
b).- Complejos solubles	
II.2.3.4.- Características analíticas	145
a).- Complejos sólidos	
b).- Complejos solubles	
II.2.3.5.- Influencia de especies extrañas...	158
II.2.3.6.- Preparados farmaceuticos	161
II.2.4.- Conclusiones	168

II.3.- ESTUDIOS CROMATICOS SOBRE LA VALORACION DE BIGUANI-
DAS CON HClO_4 EN MEDIO ACETICO GLACIAL

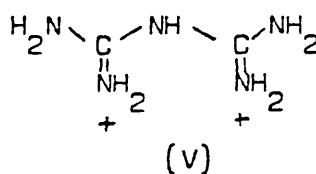
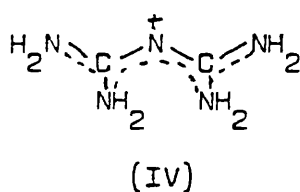
II.3.1.- Programa de cálculo	172
II.3.2.- Estudio cromático - comparativo de indica- dores	177
II.3.3.- Preparación de indicadores mixtos	203
II.3.3.1.- Violeta de metilo - amarillo de neozapon - azul de timol	204
II.3.3.2.- Violeta cristal - amarillo de neozapon - azul de timol	223
II.3.4.- Conclusiones	236

II.4.- SISTEMA CLORHEXIDINA - VERDE DE BROMOCRESOL - TRITON X-100	
II.4.1.- Ensayos previos	240
II.4.2.- Influencia del medio	247
II.4.3.- Estabilidad de las disoluciones	262
II.4.4.- Naturaleza del sistema Verde de bromocresol- Clorhexidina en presencia de Triton X-100 ...	264
II.4.5.- Determinación espectrofotométrica de Clorhe- xidina	292
II.4.5.1.- Método convencional	293
II.4.5.2.- Método FIA	302
II.4.6.- Conclusiones	331
II.5.- CONCLUSIONES GENERALES	334
II.6.- BIBLIOGRAFIA	338



I.1.- ANTECEDENTES

En disolución y para un amplio rango de condiciones de pH ésta es la forma que predomina; mientras que a pH por debajo de 3 predomina la forma diprotonada (V) que se ha visto forzada a aceptar un protón en la posición 3, perdiendo la planaridad y con ella, la deslocalización electrónica; por esta razón el protón en 3 posee carácter ácido.



Las biguanidas son por lo tanto, bases moderadamente fuertes que forman sales con ácidos orgánicos e inorgánicos y que a través de los nitrogénos 2 y 4 actúan como ligandos bidentados, combinándose con elementos de las series de transición, dando quelatos metálicos coloreados (1).

En la bibliografía consultada existe cierta confusión — con respecto a la nomenclatura. Se han utilizado indistintamente los términos biguanida, diguanida y biguanidina, siendo el 1º de ellos el que aparece con clara preferencia. Actualmente aparece en el Chemical Abstracts como diamida imidodicarbonimidica y como biguanida.

Al igual que otros compuestos relacionados con la urea — la biguanida posee varias formas resonantes, el número de posibles estructuras es grande debido a que poseen gran cantidad de grupos capaces de sufrir movimientos protónicos y mesomerismo. Esta también puede adoptar configuraciones tautoméricas e incluso puede llegar a formar un enlace intramolecular por puente de

hidrógeno, dando lugar a una estructura cíclica de seis miembros.

El conocimiento de la posición de protonación resulta de particular interés por la reactividad química y actividad fisiológica diferencial que imprime a la molécula. Este problema ha sido sometido a extensas discusiones críticas (3) (4) (5).

2.- SINTESIS

Rathke (6) preparó la biguanida por digestión de tiocarbamida y tiocianato de guanidina con tricloruro de fósforo. El método presenta un rendimiento bajo.

Mejores rendimientos presentan las síntesis que parten de la dicianidamida con adición de una molécula de amoníaco.

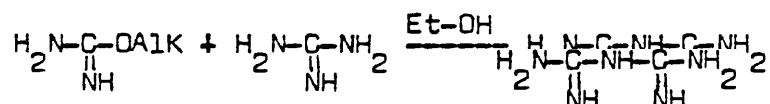
Herth (7) calentó dicianidamida con solución amoniacal de sulfato de Cu (II) a 105-110°C durante 12 horas en tubo cerrado. No obtiene productos secundarios y presenta un buen rendimiento. Se obtienen mejores resultados calentando una solución alcohólica de dicianidamida con cloruro amónico (8) .

Barnberger y Dickmann (6) calentaron una mezcla íntima de dicianidamida (5g) y cloruro amónico (8g) a 195°C durante 5-10 mn. . El resultado es aún mejor que el anterior. Sustituyendo cloruro amónico por ioduro amónico el rendimiento aumenta de 21 a 45% (9).

La biguanida como base libre fue separada al estado cristalino anhidro, a partir del correspondiente sulfato por reacción con una de las siguientes disoluciones: hidróxido de Bario, solución alcohólica de sodio metálico (10) (11), NaOH en solución alcohólica a temperatura inferior a 65°C (10) ó NH₃ líquido y una sustancia básica (12).

Oxley y Short (13) usando amoniometano ó fenilsulfonato en lugar de cloruro amónico obtienen un rendimiento del 18-30%

Shirai (14) expone una nueva síntesis con un rendimiento del 50-60%, utiliza la reacción entre o-alquilisoureas y proporciones equimoleculares de guanidina e hidroxicloruro de guanidina en etanol. Pequeñas cantidades de melanina y cianoguanidina se forman como subproductos, de acuerdo con la siguiente reacción



Un producto similar se obtiene por omonólisis de la o-metil amidino isourea (15) (16). El hidrocloreuro se trata durante 20 horas a 15-20°C en una disolución al 28% de hidróxido amónico, produciéndose biguanida con un rendimiento del 98%.

Se han sintetizado alquil y aril derivados basándose en la reacción general, indicada por COHN (17), entre l-cianoguanidina y la amina correspondiente.

3.- PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

a) Características ácido - base

Las biguanidas son bases moderadamente fuertes, forman sales mono y diácidas. Una extensa variedad tienen valores de pKa para la 1ª protonación comprendidos entre 10 y 13, éstos son comparables a los de las alquilaminas simples, las cuales poseen va

lores de pKa entre 10,5 y 11,0. Los valores de pKa para la 2ª - protonación de las biguanidas son del orden 1,9-3,3 , son por lo tanto bases más débiles que la anilina (pKa=4,4) (18) (19).

En términos generales son bases más fuertes que el amoníaco y del mismo orden que las alquilendiaminas. Comparadas con alquilendiaminas como etilendiamina y propilendiamina, las biguanidas son más fuertes como bases monoácidas pero más débiles como diácidas. Esto es posible debido a su caracter anfólitico que les permite formar complejos internos con numerosos cationes.

Las sales formadas por biguanidas y ácidos orgánicos ó inorgánicos se obtienen en forma cristalina. Las bases libres se pueden obtener a partir del sulfato, precipitando el anión con ión bario y también con sodio metálico en solución alcohólica (1).

Las bases libres son solubles en agua con fuerte reacción alcalina. Las sales inorgánicas son poco solubles en soluciones acuosas con excepción de los cloruros. Sin embargo pueden obtenerse disoluciones concentradas adicionando un hidróxido en cantidad suficiente para liberar la base. Al disminuir el pH por adición de un ácido, se forman lentamente cristales de la sal más insoluble.

La mayor parte de las biguanidas poseen un máximo de absorción alrededor de 230-240 nm. (4), que aumenta en intensidad al pasar de la especie libre a la monoprotonada (20). La banda sufre un desplazamiento batocrómico al pasar a la especie diprotonada (21). Se observa que a pH superiores a 2 (22) el espectro de la biguanida en la zona del U.V. presenta una banda de absorción característica con un máximo a 230 nm. y un mínimo que oscila alrededor de los 215 nm. . La intensidad de este máximo aumen

ta con el pH del medio hasta que éste alcanza el valor de 4. Para valores superiores de pH dicho máximo permanece aproximadamente constante.

Las disoluciones acuosas de alquilbiguanidas son estables varios días a temperatura ambiente en alcalis diluïdos, pero se descomponen en caliente produciendo guanidinas, urea y aminas en corto tiempo (5).

La hidrólisis ácida de biguanidas bajo una gran variedad de condiciones produce principalmente guanilureas (23) (24) (25). La reacción es lenta bajo condiciones suaves a temperatura ambiente. En el caso de las biguanidas sus disoluciones acuosas tienden a estar en equilibrio entre ella misma y sus productos de hidrólisis, esto es, guanilurea y amoníaco. Sin embargo, la cantidad de éste último es insignificante (1). La hidrólisis es rápida, 20 mn, en ácidos a ebullición (26) (27).

Algunos derivados como la β -fenetilbiguanida son extraordinariamente resistentes a la acción de los ácidos (5). La velocidad de hidrólisis decrece con el mayor grado de sustitución de la estructura biguanídica (28).

b) Caracteres Redox

Aunque las biguanidas son bastante reactivas, la cadena de biguanida es resistente a la oxidación. La biguanida no sustituida no reacciona con iodo (29). Igualmente la estructura de la biguanida se muestra estable frente a agentes reductores. El hierro en medio ácido mineral parece ser inefectivo. Sin embargo, este reactivo reduce a las 1-(p-nitrobencenosulfonyl) biguanidas.

La acción del ácido nitroso sobre la biguanida produce cianoguanidina. Pellizari (30) , que fué el primero en describir esta reacción, consideró que transcurría a través de la formación de un intermedio y no con la eliminación de una molécula de amoniaco como nitrito amónico, el cual debería producir productos secundarios más allá de la descomposición.

Rosenthaler (31) demostró que se forma menos de la mitad - de un mol de nitrógeno por mol de biguanida, pero no se examinaron los otros productos de reacción.

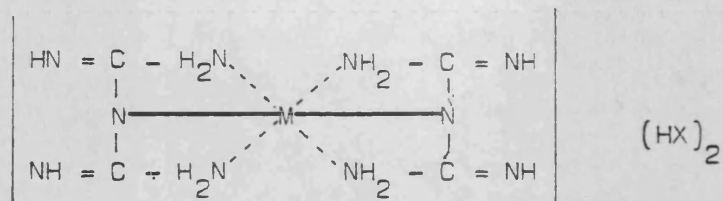
La resistencia que oponen las biguanidas a los agentes oxidantes se evidencia en su comportamiento como ligandos frente a iones metálicos de valencia elevada. Así por ejemplo, los complejos Ag(III)-biguanidas, que hemos obtenido en nuestro laboratorio (22) (18) (19), se preparan fácilmente tratando las disoluciones de Ag(I) y biguanida con persulfato, la única oxidación observada corresponde al ión metálico. Del mismo modo, todas las biguanidas que hemos estudiado con excepción de la 2-sulfoetilbiguanida, son estables en disolución de dicromato potásico.

La cadena de biguanida resulta ser bastante estable frente a agentes oxidantes y reductores, no obstante algunos complejos de la biguanida con elementos metálicos en estado de valencia poco frecuente, destacan dentro del numeroso grupo de quelatos conocidos actualmente con esta molécula por su comportamiento redox.

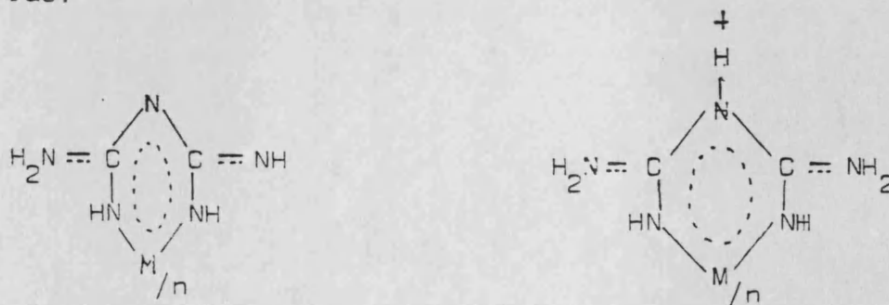
Así ocurre con los complejos de Co(III)-bis-biguanida y complejos parecidos que exhiben interesantes propiedades redox. El último producto de reducción que forman frente a varios agentes reductores, es una solución incolora o un precipitado negro; estos productos son sorprendentemente estables comparados con los productos finales en otros sistemas parecidos que resultan ser altamente reactivos. Su formulación como hidruros de Co(I) o Co(III) se confirman por varios métodos físico-químicos. Especies de Co(III) se forman como intermedios en el ciclo redox y diversos derivados organometálicos se forman también fácilmente. Datos de UV, IR, polarografía y electrolysis a potencial controlado, afirman el estado de oxidación asignado al ión metálico en los productos de reducción. La reacción que tiene lugar es semejante a la de los compuestos del tipo de la vitamina B₁₂, resultando además un mejor agente oxidante, ya que la estabilización del hidruro de cobalto está altamente favorecida en contraste a lo que ocurre para la vitamina B₁₂ (32).

Analogamente se han estudiado las aplicaciones del complejo de Ag(III) con la biguanida, como agente oxidante, siendo capaz de oxidar a iones como Hg(I), Tl(I), Cu(I), Sb(III), Fe(II), Sn(II), y I⁻ para formar complejos coloreados que pueden usarse para la detección cualitativa de los iones metálicos (33).

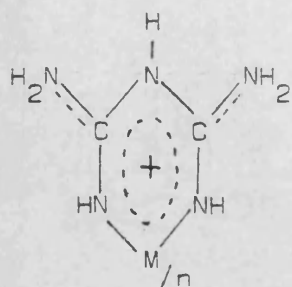
Esta estructura no representa el complejo como una sal metálica interna, y no puede explicar la formación de la anhidrobase, ni tampoco su elevada estabilidad. Por ello LEY y MULLER proponen la estructura (35):



La aceptación de la biguanida como ligando tridentado, no permite explicar la formación de numerosos complejos. Otras interpretaciones posteriores son las de SLOTTA y TSCHESCHE (36), RAY y SAHA (37). Sin embargo la explicación más satisfactoria es la propuesta por SEN (38) mediante la teoría de la deslocalización π -electrónica y justificada mediante cálculos CLOA-OM (39), reacciones de sustitución electrofílica y estudios RMN sobre complejos de Ni (II) (40). La deslocalización electrónica produce quelatos más estables y transfiere algunos electrones del metal a orbitales antienlazantes, de los cuales pueden ser eliminados por oxidación, lo que posibilita el aislamiento de complejos estables con metales en estado de oxidación elevado. En base a estos razonamientos y para los complejos $\text{M}(\text{B})_n$ y $[\text{M}(\text{BH})_n]^{n+}$ se proponen las siguientes estructuras:



Como la carga no se localiza sobre ningún átomo de nitrógeno la estructura de los complejos metal-biguanida cargados queda mejor representada por (41):



Complejos ternarios.

Dada la gran reactividad de las biguanidas y su carácter bidentado, se han obtenido numerosos complejos con los iones metálicos, muchos de ellos ya recopilados en 1961 por P.RAY (1) y en 1978 por A.SYAMAL (41).

Entre los complejos conocidos cabe destacar los complejos ternarios del tipo $ML_n(BH)_m X_a$, donde BH es la biguanida, biguanida sustituida o dibiguanida, L cualquier ligando y X, un anión precipitante. Los ligandos más frecuentes son: OH_2 , OH^- , NH_3 , $R-NH_2$, Cl^- , Br^- , I^- y SCN^- .

Se han establecido las estructuras de muchos de estos complejos mediante espectros electrónicos, IR, y estudios de rayos X estableciendo en muchos casos las dimensiones de la celda unidad, grupo espacial y sistema cristalino de los compuestos sólidos.

Así mismo se han establecido las propiedades de numerosos complejos, reactividad química, estudios cinéticos de orden de reacción, constantes de velocidad y mecanismos de disociación.

La mayoría de estos complejos son catiónicos, unos pocos neutros, y sólo son aniónicos con los iones $Fe(II)$ combinado con cianuro, $Cr(III)$ en heterocomplejos con SCN^- y $Ru(III)$ y $Rh(III)$ con Cl^- .

Estos complejos ternarios estabilizan valencias poco frecuentes de algunos elementos como $Ir(IV)$, $Rh(IV)$, $Ni(III)$, $Co(III)$ y $Mn(III)$.

Una relación exhaustiva de los complejos ternarios que forman determinados iones metálicos con biguanidas ha sido publicada recientemente (42).

4.- APLICACIONES

El campo de aplicación de las moléculas con el grupo químico biguanídico es extenso y variado. Entre otras se pueden citar las siguientes aplicaciones:

a) Se encuentran un gran número de productos industriales, adhesivos, anticorrosivos, antioxidantes, detergentes, productos de cosmética, insecticidas y fungicidas, tintes y pigmentos y productos fotográficos, entre otros.

b) Aplicaciones médicas y farmacológicas; dada su interacción con las cadenas de poliaminoácidos y otras sustancias presentes en los seres vivos, se encuentran biguanidas como bactericidas, antimalaria, inhibidores de tumores, hipoglucémicos, tratamientos oncológicos, etc.

c) En el campo de las macromoléculas de síntesis, se emplean como estabilizantes, reticuladores de resinas epoxi, etc, incluso como monómero al polimerizarse por iniciación térmica.

d) Como reactivos analíticos por formación de complejos con iones metálicos. Reacciones que a su vez pueden invertirse y utilizarse para identificar o determinar las propias biguanidas.

5.- ESTUDIOS ANALITICOS



Comparado con la elevada cantidad de citas bibliográficas existentes sobre las biguanidas, el número de trabajos referentes a las aplicaciones analíticas es francamente exiguo, y limitado a pocos campos de la química analítica.

En primera instancia las podríamos dividir en dos vertientes; utilizar las biguanidas para la identificación y/o determinación de iones metálicos y la vertiente opuesta, es decir, métodos analíticos para análisis de las biguanidas.

En el campo de la identificación cualitativa CAPITAN y SALINAS (43) proponen la fenilbiguanida como reactivo selectivo para la identificación del Cu(II), Ni(II) y Co(II). Más recientemente se han estudiado en profundidad las posibilidades como reactivos de identificación de iones metálicos de algunas biguanidas, con expresión de las condiciones adecuadas, sensibilidad y selectividad de la reacción. Concretamente se encuentran descritas la biguanida simple (22), la etilendibiguanida (18), la fenilbiguanida (19.) y la 2-sulfoetilbiguanida (44). También se han propuesto varios ensayos cualitativos basados en la observación de la forma de los cristales originados por la paludrina y compuestos relacionados con algunos reactivos.

El ácido picrolónico se ha usado en la identificación de compuestos orgánicos de carácter básico, incluyendo entre ellos biguanidas. En mezclas de diversos fármacos y una vez formados los picrolonatos respectivos, se identifican gracias a las considerables diferencias de sus temperaturas de descomposición (45)..

Gravimetrías y volumetrías

Son evidentemente los primeros procedimientos ensayados y se reducen, como era de esperar, a las reacciones más sensibles y rápidas, por tanto casi todos los métodos propuestos se basan en la reacción con Cu(II) o Ni (II). KAZARNOWSKII y col. (46), proponen la determinación de la biguanida pesando el precipitado con Ni (II). MAJUMDAR (47) hace notar la imposibilidad material de utilizar el precipitado de Ni(II)-bisbiguanida dihidróxido como procedimiento gravimétrico, dada la pérdida continua de peso durante la calefacción y a su propiedad de carbonatarse con el CO₂ del aire. Para ello pro

pone la siguiente modificación; una vez formado y filtrado el precipitado, lo disuelve en exceso medido de ácido sulfúrico. Posteriormente valora el exceso de ácido con álcali patrón e indicador de Wesselow.

La aplicación inversa, es decir, utilizando como reactivo la biguanida, ha sido propuesta por SPACU y ALBESCU (48), para determinar Ni(II). El reactivo utilizado es la paludrina y el precipitado formado $(\text{NiPal})_2(\text{OH})_2$, aplicación que hacen extensible al Cu(II).

CAPITAN y SALINAS(49) extienden la reacción de identificación del Ni(II) con fenilbiguanida para la determinación gravimétrica del mismo.

GAGE y ROSE han desarrollado un procedimiento gravimétrico con Cu(II) para la determinación de la biguanida simple (50).

Por supuesto, también se encuentra la aplicación inversa, RAY y CHOWDHURY (51) determinan Cu(II) con sulfato de biguanida, también aplican dicha determinación volumétricamente, utilizando ácido rubeánico como indicador. El cloruro de Cu(II)-biguanida ha sido propuesto para determinar Hg(II) gravimétricamente, formando la sal insoluble del anión tetraiodomercuriato con el catión complejo Cu(II)bisbiguanida. (52).

ALESSANDRO y col. (53) desarrollan un método volumétrico basado en la formación de complejo con Cu(II). El precipitado formado se filtra, lava y disuelve en H_2SO_4 , se ajusta el pH y se valora el cobre liberado con EDTA, utilizando PAN y azul de metileno como

indicadores. Métodos similares, como el desarrollado por BAILESCU (54) valoran con EDTA, el exceso de Cu(II) una vez formado el precipitado, o bien realizan la determinación directa de la base libre de la biguanida mediante la valoración potenciométrica frente a CuSO_4 .

También se han propuesto reacciones con otros iones metálicos. Así se determina la paludrina por SOLOMON (55), pesando el precipitado tetraiodiandiamincromato (III).

Dentro de las aplicaciones puramente volumétricas, cabe citar la valoración de 1-1-dimetilbiguanida-HCl (56), consistente en bloquear el halógeno con $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ y valorando la biguanida liberada con ácido perclórico y como indicador verde de malaquita.

SPINKS y col. (57) determinan la pureza de la paludrina mediante valoración con ácido perclórico en acético glacial. Procedimiento propuesto por la BP y UK como método standard para la determinación de biguanidas; la valoración se sigue potenciométricamente ó bien utilizando indicador visual de punto final (violeta cristal).

El sulfato ácido de biguanida monohidratado, ha sido propuesto con éxito como sustancia patrón tipo primario en acidimetrías. Resulta más barato y estable que otros patrones primarios comunes (58) (59).

Un procedimiento recientemente propuesto (60) establece la valoración de disoluciones básicas de cianuro, argentométricamente,

usando como indicador el complejo ternario de Fe(II)-CN-fenilbiguanida, en presencia de EDTA. Dicho método da puntos finales bien definidos y resultados similares a otros métodos de valoración de cianuro, siendo el rango de aplicación de 10^{-1} a 10^{-4} M en cianuro. También se ha descrito el complejo soluble Cu(II)-CN-Fenilbiguanida y el precipitado que forma dicha especie con zephiramina, proponiéndose éste para la determinación de Cu(II), siendo su factor gravimétrico 0,0489 (61).

Dentro de las valoraciones con indicadores físicos son pocos los trabajos existentes. Se pueden citar las valoraciones conductimétricas basadas en la reacción con Cu(II) y etilendibiguanida (18) y la reacción entre la fenilbiguanida y el Ni(II) (62), ambos desarrollados en nuestro departamento. BAILESCU en el trabajo citado anteriormente también propone liberar la base libre potenciométricamente frente a CuSO_4 .

WANG y DING (63) (64) han propuesto dos modificaciones al método standard, determinando acetato de clorhexidina y clorhidrato de moroxidina, respectivamente.

PINZAUTI (65) determina clorhexidina potenciométricamente utilizando un electrodo de Ag-sulfito de plata y como valorante tetrafenilborato sódico.

Aplicaciones espectrofotométricas

Uno de los primeros métodos para la determinación de paludrina y compuestos relacionados en muestras de sangre, está basado en

la conversión cuantitativa a aminos por hidrólisis bajo presión. Aminas que una vez diazotadas se evalúan colorimétricamente (66) (67). Otros procedimientos extracto-colorimétricos se han desarrollado teniendo en cuenta la formación de pares iónicos entre la clorhexidina y colorantes aniónicos (66)(67)(68)(69)(70). ANDERMANN (71) propone el verde de bromocresol y PINZAUTI (72) el naranja de metilo, ambos utilizan cloroformo como extractante. LOWRY (73) propone un procedimiento directo para la evaluación de la mencionada biguanida con azul de bromotimol a pH 7.5, basado en la reducción de la absorbancia de éste en disolución acuosa después de la complejación con la clorhexidina. Este método ha sido criticado alegando que conduce a grandes errores (71) (72).

La β -fenetilbiguanida se ha determinado colorimétricamente con un tratamiento previo con α -naftol, diacetilpropanol e hidróxido de sodio, siendo el límite de detección de $5 \cdot 10^{-6}$ g. (74) (75).

La 1,1 dimetilbiguanida, se ha determinado también por procedimientos colorimétricos basados en su reacción con diacetilo en presencia de α -naftol (76) o en una reacción de Sakaguchi, modificada (77) (78).

La N',N'-anhidro bis (β -hidroxietil) biguanida ha sido determinada en tabletas, por un procedimiento espectrofotométrico de medida directa de su absorbancia a 241nm en etanol (79).

La determinación de Fe en medio alcalino es posible por medidas de la absorbancia a 520 nm de las disoluciones rojas del complejo $\text{Fe}(\text{PhBH})(\text{CN})_4^{2-}$. Se cumple la ley de Beer con un intervalo óptimo entre 1,3 y 6,7 ppm. El pH tiene una influencia decisiva en el método, siendo el intervalo aconsejado entre 10 y 11 (60).

Otros procedimientos colorimétricos ya vienen citados en el apartado anterior ya que son simples modificaciones del proceso gravimétrico por disolución del precipitado formado, con el disolvente adecuado y posterior lectura del valor de su absorbancia. Entre ellos se pueden mencionar la disolución del precipitado de tetracianodiamincromato en acetona (55) ; y la disolución en alcohol del precipitado de Ni(II) y paludrina propuesto por SPACU y ALBESCU (48).

Aplicaciones cromatográficas

Pocos son los datos acerca del comportamiento cromatográfico de las biguanidas libres; únicamente se han obtenido curvas de elución de la biguanida en presencia de compuestos relacionados como cianamida, cianoguanidina, guanidina, urea y tiourea (74). Así mismo se conocen datos acerca del comportamiento en cromatografía gaseosa de 1,1,2,2,4,4,5 heptametil y 1,1,2,2,5,5 hexametilbiguanida (75), siendo éste el único trabajo en el que se cita esta técnica cromatográfica.

Por otro lado sí que se encuentran descritos algunos desarrollos cromatográficos de complejos metal-biguanida, empleándose en todos los casos la técnica de cromatografía plana en papel; no encontrándose otras técnicas cromatográficas con estos complejos.

Así en estos estudios puede observarse la influencia que puede tener la sustitución alquil o aril en la molécula de biguanida. Se han descrito los valores de Rf de los complejos cuadrado-planos de Cu(II), Ni(II) y Pd(II) bisbiguanida, con distintos sustituyentes; los desarrollos fueron realizados con mezclas de KCl-piridina, observándose un aumento en los valores de Rf, al aumentar la alquilsustitución, mientras que la fenilsustitución disminuye éste. Así mismo para los iones metálicos se observa un decrecimiento de los Rf en el orden Ni > Cu > Pd (55).

Se observa la influencia que puede tener el anión precipitante en los desarrollos cromatográficos. Así en el caso del complejo $[\text{Co}(\text{BH})_3]_2 (\text{SO}_4)_3$ con un Rf de 0,69, se observa que al cambiar el anión SO_4^{2-} por otros aniones el valor de Rf varía, atribuyéndose ésta variación a la diferencia en la extensión de la esfera externa de asociación de los complejos (41).

En el estudio cromatográfico de algunos heteroquelatos de Co(III) (76) (77) se pone de manifiesto la naturaleza electrostática de la adsorción de los complejos en el papel, observándose que para estos complejos, los valores de Rf encontrados son menores que los obtenidos para cationes divalentes, lo cual indica que los cationes tripositivos son atraídos más fuertemente que los bipo- sitivos. También se ha observado en el desarrollo de algunos heteroquelatos de biguanida con Cu(II), la aparición de dos manchas. Así ocurre en los complejos del tipo $[\text{CuL}(\text{BH})] \text{X}$ donde L = glicina, α = alanina y BH = biguanida, metilbiguanida, etilbiguanida y X = Cl (77).

Se encuentra descrita la aplicación de la l-butilbiguanida-HCl (silubín) como eluyente en la separación de mezclas de tres ó cuatro antidiabéticos y sulfonamidas por cromatografía de capa fina sobre soporte de gel de sílice (78).

Recientemente se han desarrollado diferentes métodos cromatográficos para la determinación de clorhexidina en diversos preparados farmacéuticos, casi todos se basan en la conversión previa de ésta en triazinas. LAKE (79) utiliza HPLC en fase invertida, MATSUS HIMA utiliza la técnica "mass fragmentography" (80)(81) para determinar la biguanida en muestras biológicas y la "cromatografía líquida (82) para la evaluación en desinfectantes. BAUER(83) propone la "ion pair" HPLC para la clorhexidina en dentífricos y MIRIBEL (84) convierte la biguanida en un derivado sililado para luego evaluarla mediante cromatografía gas-líquido.

Aplicaciones polarográficas

Sólo unos pocos complejos metal-biguanida han sido estudiados mediante ésta técnica electroquímica. Se conocen referencias acerca del comportamiento polarográfico de estos complejos con los siguientes iones metálicos: Ag(III), Mn(IV), Ni(II), Ni(III) y Cu(II) siendo además bastante recientes.

Se ha estudiado la reducción electroquímica del nitrato de Ag(III)-etilendibiguanida, observándose que, en presencia de KNO_3 como electrolito soporte, no tiene lugar la reducción de la Ag(III) (85).

Para los complejos $[\text{Mn}(\text{OH})_2(\text{BH})_2]^{n+} (\text{OH})_n$, donde BH=biguanida y $n=1,2$, se muestran tres estados de reducción para el complejo de

Mn(III). Para el complejo de Mn(IV), el primer salto corresponde a 2 electrones para dar el Mn(II), con un potencial de semionda aproximadamente igual al de la reducción del Mn(II) (86).

Varios autores han estudiado el comportamiento de los complejos de Ni(II)-biguanida por polarografía. Así SENGUPTA y BANERGEA (87) estudian el compuesto $Ni(BH)_2^{2+}$ en KNO_3 0,1 M. Todas las especies sufren difusión controlada transfiriendo $2e^-$ al electrodo de gota de Hg. afirmando que el proceso de reducción es reversible. Más recientemente DUTTA y SEN (88) estudian este mismo complejo en KCl acuoso contenido gelatina, exponiendo los valores de $E_{1/2}$, constantes de velocidad y energía de activación de estos compuestos. Las constantes de estabilidad calculadas por este método para los complejos del tipo Ni-biguanida son comparables a las obtenidas por métodos potenciométricos.

SEN y SAHA (89), oxidando los complejos de Ni(II)-biguanida obtienen los correspondientes de Ni(III) del tipo $[NiBr_2(BH)_2]Br$; $[NiCl_2(BH)_2]X$, donde BH=biguanida y X=F, Cl. Para el caso del complejo $[NiCl_2(BH)_2]Cl$ la reacción de reducción de $1e^-$, resulta ser reversible (41).

Recientemente se ha estudiado la reducción polarográfica de los complejos de Cu(II): $[Cu(BH)_2]Cl_2$ donde BH= biguanida, N-metil N-etil-, NNdimetil-, NN-dietil-, N-fenilbiguanida y 1/2 etilendibiguanida en solución 0,5 M de KCl con 0,01% de gelatina. Excepto para el complejo de etilendibiguanida, los compuestos muestran dos ondas bien definidas y dependientes del pH. Estas bandas fueron atribuidas al mono y bisbiguanida de Cu(II) respectivamente. (90)

En nuestro departamento se ha llevado a cabo el estudio polarográfico de la fenilbiguanida (91), y se ha propuesto un método de determinación simultánea de clorhexidina y proguanil utilizando la onda catódica, que presentan ambas en medio agua-dimetilformamida (92). También se ha propuesto un método de determinación de Cu(II) por ASV a partir del complejo que forma con la biguanida simple y se han caracterizado los complejos con Cr(III) y Mn(IV) y la mencionada biguanida (93).

6.- COMPUESTOS ESTUDIADOS

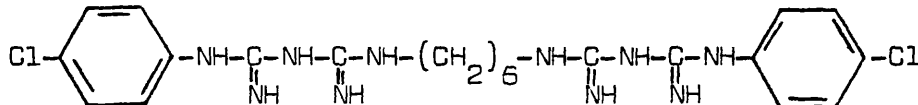
En la presente memoria se proponen diferentes métodos para la determinación de biguanidas, enclavando el estudio dentro de la línea de investigación que viene desarrollándose en nuestro Departamento desde hace unos cuantos años: "Estudios químico-analíticos de las biguanidas". Se han elegido como representantes de este grupo formado por el compuesto simple que les da nombre y sus derivados, aquellas que se encuentran en el mercado farmacéutico español formando parte de diversos preparados, ya sean en solución ó en tabletas, y que son:
Clorhexidina, proguanil, metformin y moroxidina.

También se calculan las constantes de los compuestos que forma la 2-sulfoetilbiguanida con Cu(II); en nuestro Departamento se puso a punto el método de síntesis y purificación, así como el estudio analítico-cualitativo de su reactividad con iones metálicos y la descripción de los complejos formados con Cu(II).

CLORHEXIDINA

La clorhexidina es una bisbiguanida que presenta las propiedades químicas generales de las biguanidas, con valores de pK_{a1} de $2,3 \pm 0,1$ y pK_{a2} de $10,4 \pm 0,2$ (94), formando complejos sólidos con $Cu(II)$, $Ni(II)$ y $Co(II)$ en medio básico y con $Mo(VI)$ en medio acético.

El hecho de poseer un radical hexametileno entre sus dos grupos biguanidos le confiere unas características químico-físicas diferenciadas de sus homólogos y en particular de la paludrina, a la que dobla prácticamente en fórmula química. Así la clorhexidina ó tetraazatetradecanodiimidamina N,N'' -bis(4-clorofenil)-3,12-diimino, muestra un carácter relativamente lipófilo, lo que sin duda está relacionado con la longitud de la cadena alifática entre los dos grupos biguanidos (95). Y aquí radica el gran interés farmacológico y de aplicación química.



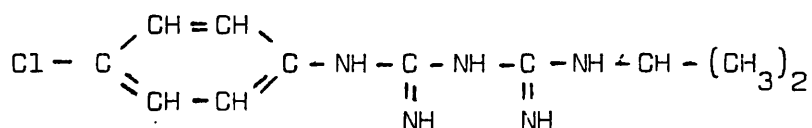
Es posible preparar disoluciones hidro-orgánicas. Su adsorción a las superficies orgánicas, relacionada con su gran tamaño molecular, y su baja solubilidad en agua, originan generalmente una buena fijación a lo largo del tiempo en un gran número de sistemas biológicos e industriales. Y por último, la capacidad de giro y flexión de los 8 enlaces sigma entre dos grupos biguanidos, da presumiblemente a la molécula una gran versatilidad en unas interfases (97) ó por ejemplo en una membrana celular (98) ó en un epitelio (99).

La clorhexidina es utilizada ampliamente como bactericida en el campo farmaceutico. En el Chemical Abstracts aparecen numerosas citas que hacen referencia a la utilizacion de esta en cosmetica, en disoluciones para el lavado de lentes de contacto, en dentrifi-
cos, desodorantes, etc., asi como al estudio de su efecto en el or-
ganismo humano.

PROGUANIL

Mas comunmente llamado Paludrina, nombre que deriva de la uti-
lizacion de este farmaco contra el paludismo, otra denominacion es
Clorhidrato de N-(H-clorofenil)-N'-(1-metiletil) imidodicarbonimi-
dico diamida, presenta las caracteristicas quimicas tipicas de las
sales de biguanidas, siendo mas soluble en agua que la clorhexidina,
con valores de pKa1= 2.3±0.1 y pKa2= 10.4±0.2 (94), y disolviendose
bien en medios organicos. Tambien reacciona con el Cu(II), Ni(II) y
Co(II) en medio basico dando precipitados de color rosado, amarillo
y rosa respectivamente. Con Mo(IV) en medio acético da lugar a un
sólido blanco.

Tal y como puede apreciarse en su formula desarrollada,



la presencia de radicales, -4 clorofenil y -metil etil, como sustituyentes a ambos lados del grupo biguanido, originan un efecto electrónico no equivalente de los radicales sobre la gran acumulación electrónica que supone el grupo biguanido, lo cual, unido a otras propiedades químico-físicas interrelacionadas, como pueden ser la estructura molecular y el carácter tensoactivo, conllevan a la específica aplicación farmacológica, donde la configuración electrónica del grupo biguanido (100) (101) (102) característica de un sistema π , va a marcar las pautas de comportamiento biológico. Alternativamente otro tanto puede decirse de cara a sus aplicaciones industriales.

La estructura espacial del Clorhidrato de proguanil ha sido determinada por Brown (103) a partir de estudios con rayos X. Este autor llega a la conclusión de que, para la especie catiónica +1 en estado sólido, el grupo biguanido en la paludrina, presenta dos planos electrónicos que forman entre sí un ángulo próximo a 60°. Y otros autores (104) (105) confirman la existencia de estos dos planos para la forma catiónica +1 en otras biguanidas, mientras que para la forma básica se presenta un único plano π electrónico, y la forma catiónica +2 presenta un carácter bipiramidal. Lo cual es coherente con el comportamiento espectroscópico observado en disolución.

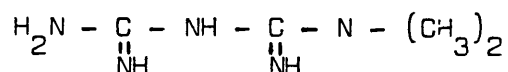
La acción antipalúdica de la paludrina parece ser debida a la existencia de un metabolito activo derivado de ella, (diaminodimetil-p-clorofeniltriazina), el cual tiene la propiedad de impedir la división nuclear de los esquizontes formados en el proceso malárico, actuando como supresor del mismo (106).

METFORMINA

En el Chemical Abstracts aparece tambien con la denominación de ácido N,N-dimetil Imidodicarbonimidicodiamida. Es más soluble en agua que la clorhexidina y el proguanil, pero participa de la característica comun a todas las biguanidas de presentar buena solubilidad tanto en medios acuosos como organicos. Los complejos que forma con Cu(II), Ni(II) y Co(II) en medio basico son solubles, a diferencia de lo que ocurre con los obtenidos con las biguanidas descritas anteriormente, no forma complejos con Mo(IV) en medio acetico.

Su comportamiento químico general permite encuadrarla dentro de este grupo de complejos.

La formula desarrollada es



La utilizacion en farmacia se debe a su acción hipoglucemiante que parece relacionada con la formación de complejos pseudoaromaticos con cationes metalicos, lo que afecta al equilibrio ionico en algunas partes del organismo (107) (108) (109) (110).

Existen en la bibliografía, relativamente pocas citas que estudien el empleo en el campo farmacéutico del indicador conductimétrico de punto final, siendo la totalidad de los trabajos publicados valoraciones ácido-base desarrolladas en medios acuosos o no acuosos.

a) Medios acuosos.

Kolthoff (113) determina conductimétricamente codeína, atropina y otros alcaloides en solución acuosa con una base fuerte, siendo la exactitud y precisión del método superiores a las obtenidas utilizando como indicador visual de punto final la fenolftaleína. Se pueden determinar complejos multifuncionales, tales como resorcinol, pirogalol y ácido salicílico, si se adiciona a la solución a valorar un exceso de una base débil, tal como el amoníaco (114).

Las sulfoftaleínas se valoran con una base fuerte apareciendo dos cambios de pendiente en la curva de valoración, el primero se debe a los grupos sulfónicos y el segundo a los fenólicos (115).

Las reacciones de reemplazamiento de ácidos o bases débiles de sus sales, mediante la acción de ácidos y bases fuertes, permiten la determinación conductimétrica de benzoatos, succinatos, oxalatos y fosfatos (115).

b) Medios no acuosos.

Van Meurs y Dahmen (116) utilizan como disolventes metanol, N,N-dimetilformamida y piridina con valorantes tales como metoxi-

do potásico e hidróxido de tetrametilamonio disueltos en, metanol-benzeno o piridina-benzeno y piperidina. Obtienen gráficas en forma de N al valorar ácido salicílico con metóxido de potasio en dimetilformamida; la conductividad aumenta durante la valoración del ácido carboxílico disminuyendo posteriormente como resultado de la precipitación de la sal dipotásica. Curvas similares se obtienen en las valoraciones de ácidos dipróticos con hidróxido de tetrametilamonio disuelto en dimetilformamida.

Maryot (117) fue el primero que observó e interpretó el máximo que aparece en las valoraciones conductimétricas del ácido tricloroacético con amina alifáticas disueltas en benzeno y dioxano.

La determinación de fenoles sustituidos disueltos en tolueno utilizando como valorante hidróxido de tetrabutilamonio en isopropanol la realizan, Bruss y Harlow (118). Atribuyen el máximo que aparece en las curvas de valoración a la homoconjugación de las sustancias implicadas. Una discusión mas detallada al respecto la proporciona Davis (119).

Diversas valoraciones conductimétricas de fenoles, ácidos dipróticos (curvas en forma de N), ácidos p-hidroxibenzoicos y otros ácidos benzoicos sustituidos disueltos en ter-butanol son realizadas por Marple y Scheppers (120).

Coetzee y Cunningham (121) valoran conductimétricamente n-butilamina con ácido benzoico disuelto en acetonitrilo.

Kalthoff determina 4-nitrofenolato en acetonitrilo con ácido perclórico en medio acético glacial (122) y ácido dicloroacético con trietilamina disuelta en acetonitrilo (123).

I.1.3.- ESTUDIO DE LAS TRANSICIONES DE COLOR DE INDICADORES VISUALES DE PUNTO FINAL.

Las cualidades requeridas para un indicador visual del punto final son: exactitud, rapidez y nitidez en la transición. La primera de estas cualidades puede ser evaluada tanto mediante cálculos teóricos como experimentalmente. La segunda depende de diversos factores, entre ellos los equilibrios competitivos que tienen lugar y la cinética de dichos equilibrios. La tercera de estas cualidades depende de la percepción subjetiva del color; no obstante, también esta cualidad puede ser evaluada de un modo menos subjetivo mediante el uso de los principios de la teoría del color.

De modo somero se exponen a continuación algunos de los postulados de dicha teoría (124).

a).- Cualquier color puede ser definido como una combinación lineal de tres colores primarios, rojo, verde y azul.

b).- Si un haz de luz formado por cantidades conocidas de tres componentes primarios es equivalente en color a una luz

desconocida, las tres cantidades conocidas pueden ser utilizadas como una especificación del color para dicha luz. Dichas cantidades (X, Y y Z) se denominan "valores triestímulus" del color (ley de Newton).

c).- La ley de Grassman establece que cuando luces equivalentes se adicionan a luces equivalentes la luz resultante es equivalente.

Cualquier haz de radiación bien sea originado por una fuente luminosa o reflejado o transmitido por un cuerpo luminoso, puede considerarse formado por un gran número de porciones del espectro. Las cantidades de estas porciones pueden ser determinadas por espectrofotometría.

Los valores triestímulus \bar{x} , \bar{y} , \bar{z} para cada una de estas porciones del espectro han sido establecidos por numerosos observadores normales (sin defectos visuales) y los valores promedios encontrados se muestran en la tabla 1 y figura 1. Dichos promedios se establecen en unidades arbitrarias, para un espectro monocromático ($\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$) de densidad de flujo unidad y que incide sobre un cm^2 de superficie (watts/ $\text{cm}^2 \text{ nm}$ esta magnitud recibe el nombre de "spectral irradiance").

En 1931 la Comisión Internacional sobre Iluminación (C.I.E.) recomendó que todos los datos de color se expresaran en el mismo sistema de valores triestímulus para que los valores pudieran ser

TABLA 1

TIRE 1931 I.C.I. STANDARD OBSERVER

Wave-length, m μ	Tristimulus Specifications of Equal-energy Spectrum			Wave-length, m μ	Tristimulus Specifications of Equal-energy Spectrum		
	\bar{x}	\bar{y}	\bar{z}		\bar{x}	\bar{y}	\bar{z}
380	0.0014	0.0000	0.0005	580	0.9163	0.8700	0.0017
385	.0022	0.0001	0.0105	585	0.9786	.8163	.0014
390	.0042	0.0001	0.0201	590	1.0263	.7570	.0011
395	.0076	0.0002	0.0302	595	1.0567	.6949	.0010
400	.0143	0.0004	0.0679	600	1.0622	.6310	.0008
405	.0232	0.0006	0.1102	605	1.0456	.5668	.0006
410	.0435	0.0012	0.2074	610	1.0026	.5030	.0003
415	.0776	0.0022	0.3713	615	0.9384	.4412	.0002
420	.1344	0.0040	0.6456	620	0.8544	.3810	.0002
425	.2148	0.0073	1.0391	625	0.7514	.3210	.0001
430	.2839	0.0116	1.3856	630	0.6424	.2650	.0000
435	.3285	0.0168	1.6230	635	0.5419	.2170	.0000
440	.3483	0.0230	1.7471	640	0.4479	.1750	.0000
445	.3481	0.0298	1.7826	645	0.3608	.1382	.0000
450	.3302	0.0380	1.7721	650	0.2835	.1070	.0000
455	.3187	0.0480	1.7441	655	0.2187	.0816	.0000
460	.2908	0.0600	1.6692	660	0.1649	.0610	.0000
465	.2511	0.0739	1.5281	665	0.1212	.0446	.0000
470	.1954	0.0910	1.2876	670	0.0874	.0320	.0000
475	.1421	0.1126	1.0419	675	0.0636	.0232	.0000
480	.0956	0.1390	0.8130	680	0.0468	.0170	.0000
485	.0580	0.1693	0.6102	685	0.0329	.0119	.0000
490	.0320	0.2080	0.4652	690	0.0227	.0082	.0000
495	.0147	0.2586	0.3523	695	0.0158	.0057	.0000
500	.0049	0.3230	0.2720	700	0.0114	.0041	.0000
505	.0024	0.4073	0.2123	705	0.0081	.0029	.0000
510	.0003	0.5030	0.1582	710	0.0058	.0021	.0000
515	.0291	0.6082	0.1117	715	0.0041	.0015	.0000
520	.0633	0.7100	0.0782	720	0.0029	.0010	.0000
525	.1096	0.7932	0.0573	725	0.0020	.0007	.0000
530	.1655	0.8620	0.0422	730	0.0014	.0005	.0000
535	.2257	0.9149	0.0298	735	0.0010	.0004	.0000
540	.2904	0.9540	0.0203	740	0.0007	.0003	.0000
545	.3597	0.9803	0.0134	745	0.0005	.0002	.0000
550	.4334	0.9950	0.0087	750	0.0003	.0001	.0000
555	.5121	1.0002	0.0057	755	0.0002	.0001	.0000
560	.5945	0.9950	0.0039	760	0.0002	.0001	.0000
565	.6784	0.9786	0.0027	765	0.0001	.0000	.0000
570	.7621	0.9520	0.0021	770	0.0001	.0000	.0000
575	.8425	0.9154	0.0018	775	0.0000	.0000	.0000
580	.9163	0.8700	0.0017	780	0.0000	.0000	.0000
Totals				21.3713	21.3714	21.3715	

- tomada de M.G. MELLON "Analytical Absorption Spectroscopy"

Wiley, New York 1950, pag. 520.

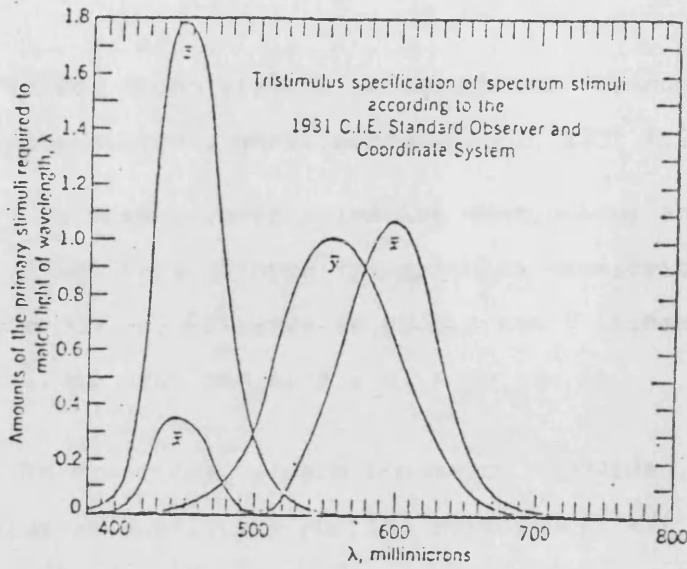


FIGURA 1. Valores triestímulo del espectro de colores según el Observador Standard de I.C.I. 1931. Figura reproducida de M.G. Mellon (1).

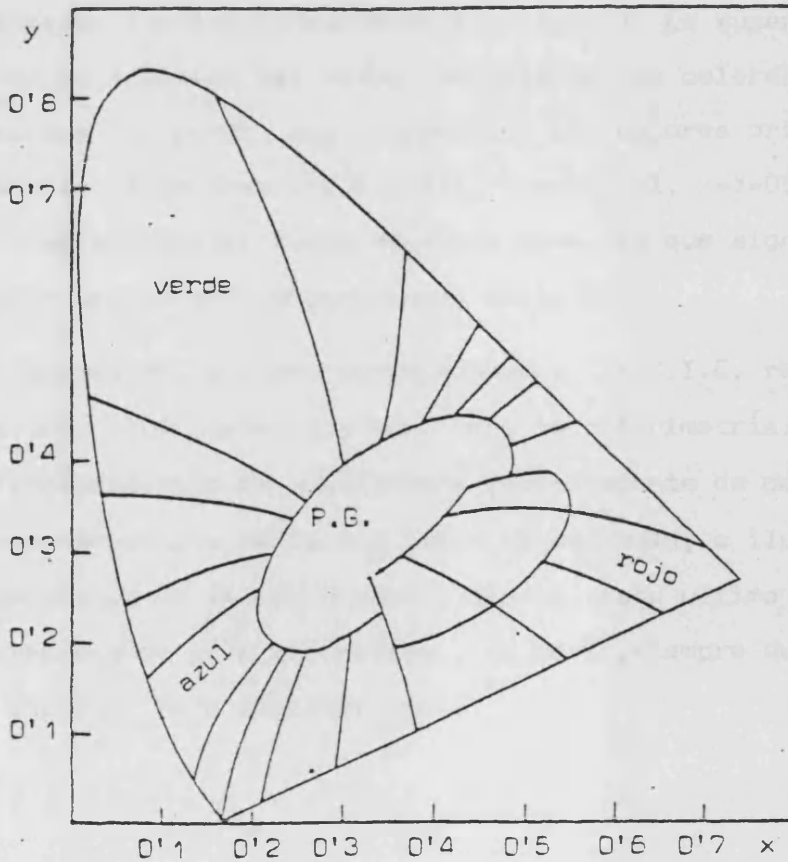


FIGURA 2. Diagrama de cromaticidad. Triángulo de Maxwell.

comparables, dicho sistema se conoce por "standard colorimetric coordinate system", abreviadamente, CIE 1931 (125).

Los tres colores primarios mencionados anteriormente se a socian a los tres valores triestímulus necesarios para definir cualquier color. El verde se asocia con Y (llamado también luminosidad), el azul con el X y el rojo con Z.

En ocasiones, y para una mayor comodidad, los valores triestímulus se sustituyen por las relaciones: $X/(X+Y+Z)$, $Y/(X+Y+Z)$ y $Z/(X+Y+Z)$ cuyos valores x, y, z se denominan "coordenadas de cromaticidad". Por definición, la suma de las tres es la unidad, por tanto, bastan las coordenadas x e y para definir un color o lo que es lo mismo un punto en el diagrama de cromaticidad, llamado "triángulo de Maxwell" (fig. 2). La superficie encerrada en el interior del mismo, representa los colores reales. O bserve que los puntos que representan los colores primarios del sistema de coordenadas C.I.E ($x=1, y=z=0$; $y=1, x=z=0$; $y=z=1, x=y=0$) se encuentran fuera de dicha área, lo que significa que dichos primarios son imaginarios (tabla 2).

Además del sistema de coordenadas, la C.I.E. recomienda el uso de tres iluminantes standard para la colorimetría: iluminante A representativo de una lámpara incandescente de gas; iluminante B representativo de la luz solar al mediodía; e iluminante C representativo de la luz promedio diurna. Este último iluminante se recomienda para uso general, es decir, siempre que no haya razón especial para utilizar otro.

TABLA 2

CHROMATICITY COORDINATES OF THE SPECTRUM COLORS

Wave-length, m μ	Chromaticity Coordinates			Wave-length, m μ	Chromaticity Coordinates		
	x	y	z		x	y	z
380	0.1741	0.0050	0.8209	580	0.5125	0.4866	0.0009
385	.1740	.0050	.8210	585	.5448	.4544	.0008
390	.1738	.0049	.8213	590	.5752	.4242	.0006
395	.1736	.0049	.8215	595	.6029	.3965	.0006
400	.1733	.0048	.8219	600	.6270	.3725	.0005
405	.1730	.0048	.8222	605	.6482	.3514	.0004
410	.1726	.0048	.8226	610	.6658	.3340	.0002
415	.1721	.0048	.8231	615	.6801	.3197	.0002
420	.1714	.0051	.8235	620	.6915	.3083	.0002
425	.1703	.0058	.8239	625	.7006	.2993	.0001
430	.1689	.0069	.8242	630	.7079	.2920	.0001
435	.1669	.0086	.8245	635	.7140	.2859	.0001
440	.1644	.0109	.8247	640	.7190	.2809	.0001
445	.1611	.0138	.8251	645	.7230	.2770	.0000
450	.1566	.0177	.8257	650	.7260	.2740	.0000
455	.1510	.0227	.8263	655	.7283	.2717	.0000
460	.1440	.0297	.8263	660	.7300	.2700	.0000
465	.1355	.0399	.8246	665	.7311	.2689	.0000
470	.1241	.0578	.8181	670	.7320	.2680	.0000
475	.1096	.0868	.8036	675	.7327	.2673	.0000
480	.0913	.1327	.7760	680	.7334	.2666	.0000
485	.0687	.2007	.7306	685	.7340	.2660	.0000
490	.0454	.2950	.6596	690	.7344	.2656	.0000
495	.0235	.4127	.5638	695	.7346	.2654	.0000
500	.0082	.5384	.4534	700	.7347	.2653	.0000
505	.0039	.6548	.3413	705	.7347	.2653	.0000
510	.0139	.7502	.2359	710	.7347	.2653	.0000
515	.0389	.8120	.1491	715	.7347	.2653	.0000
520	.0743	.8338	.0919	720	.7347	.2653	.0000
525	.1142	.8262	.0596	725	.7347	.2653	.0000
530	.1547	.8059	.0394	730	.7347	.2653	.0000
535	.1929	.7816	.0255	735	.7347	.2653	.0000
540	.2296	.7543	.0161	740	.7347	.2653	.0000
545	.2658	.7243	.0099	745	.7347	.2653	.0000
550	.3016	.6923	.0061	750	.7347	.2653	.0000
555	.3373	.6589	.0028	755	.7347	.2653	.0000
560	.3731	.6215	.0024	760	.7347	.2653	.0000
565	.4087	.5806	.0017	765	.7347	.2653	.0000
570	.4441	.5547	.0012	770	.7347	.2653	.0000
575	.4788	.5202	.0010	775	.7347	.2653	.0000
580	.5125	.4866	.0009	780	.7347	.2653	.0000

- tomada de M.G. MELLON " Analytical Absortion Spectroscopy"

Wiley, New York 1950, pag. 524.

En el caso de un indicador, el color que presenta la disolución antes y después del punto final puede representarse por sendos puntos en el diagrama de cromaticidad. Igualmente los colores de la disolución durante la transición vendrán representados por puntos en el diagrama. La distancia entre los puntos antes y después del punto final es una medida de la calidad del viraje del indicador.

MacAdam en 1942 (126) dividió el triángulo de Maxwell en elipses, la superficie encerrada por estas representa tonalidades de color difícilmente discernibles visualmente.

Debido a que la percepción de las coloraciones es un hecho subjetivo, no solo la distancia entre los colores antes y después del punto final, sino y sobre todo, la zona en que se encuentren dichos puntos, determina la calidad de un indicador. Así pues, un indicador cuyo viraje sea azul-púrpura es más perceptible que uno cuyo viraje sea verde-amarillo.

El CIE 1931 (125), no es el único sistema cromático propuesto. Existen otros posteriores tratando de definir un espacio cromático más uniforme. Algunos de estos sistemas se han utilizado en trabajos analíticos, como son: RUCS 1939 (127), CIE 1960 (128) y últimamente CIE $L^*a^*b^*$ 1976 (129). Las ecuaciones básicas de los mismos se detallan en la tabla 3 (130).

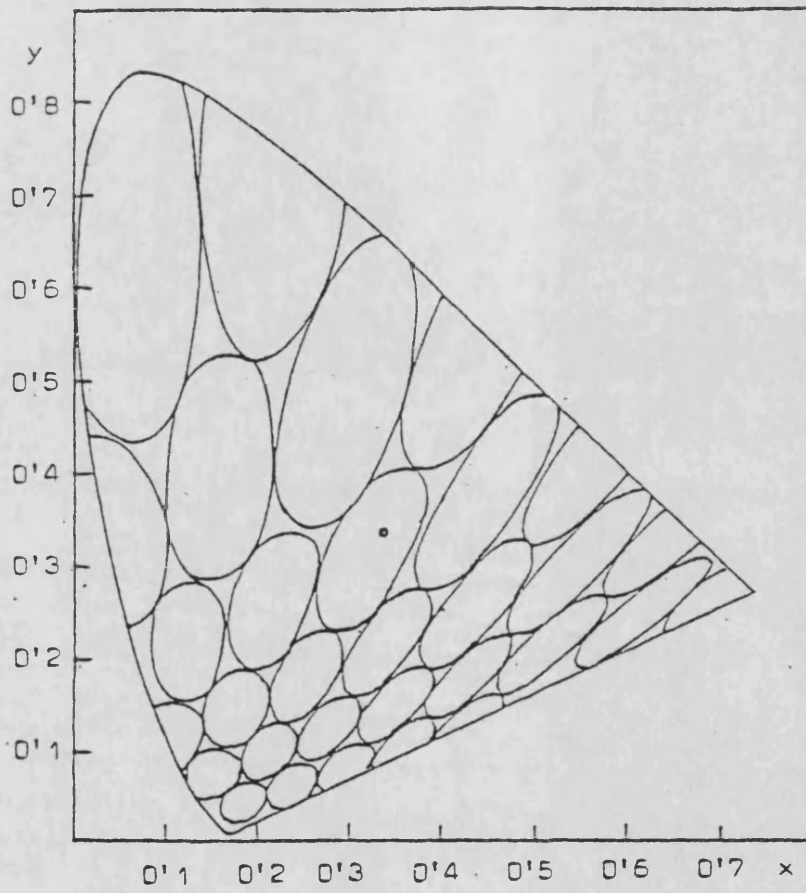


FIGURA 3 . Diagrama de cromaticidad. Elipses de MacAdam.

<p><u>VALORES TRIESTIMULOS</u></p> $X = \sum (x E)_{\lambda} A \quad Y = \sum (y E)_{\lambda} A \quad Z = \sum (z E)_{\lambda} A$	
<p><u>CIE 1931</u></p> $x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z}$	
<p><u>RJCS 1939</u></p> $U = 0.75 - \frac{0.823 (x + y - 1)}{x - 7.053y - 1.640}$ $V = \frac{3.697x - 5.077y - 1.369}{x - 7.053y - 1.640}$	
<p><u>CIE 1960</u></p> $u = \frac{4 X}{X + 15 Y + 3 Z}$ $v = \frac{6 Y}{X + 15 Y + 3 Z}$	
<p><u>CIE 1976</u></p> $a^* = 500 (F (1) - F (2))$ $b^* = 200 (F (2) - F (3))$ $L^* = 116 (F (2) - 0,1379)$	<p>$F (i) = G (i)^{1/3}$</p> <p>$F (i) = 7,787 G (i) + 0,1379$</p> <p>para $i = 1, 2, 3$ si $G (i) > 0,008856$</p> <p>donde: y: si $G (i) \leq 0,008856$</p> <p>$G (1) = X/X_n$</p> <p>$G (2) = Y/Y_n$</p> <p>$G (3) = Z/Z_n$</p>

TABLA 3. Distintos sistemas de coordenadas cromáticas.

Ademas de representar gráficamente la transición de color de un viraje, existen otros métodos de valorar la calidad de un indicador. Uno de ellos es utilizar la "concentración de color" o "concentración óptica" (131) representada por el simbolo J y que viene dada por:

$$J = \frac{(A \bar{x} E) + (A \bar{y} E) + (A \bar{z} E)}{(\bar{x} E) + (\bar{y} E) + (\bar{z} E)}$$

J puede ser considerada como una transmitancia efectiva, teniendo en cuenta tanto la transmitancia absoluta como la capacidad del ojo para detectarla.

La magnitud de las relaciones $\Delta J / \Delta pH$, $\Delta J / \Delta v_{val.}$ y $\Delta J / \Delta E (mV)$ en el punto final es representativa, no solo de la nitidez del viraje, sino tambien de su exactitud; ya que visualiza la concordancia entre el cambio brusco de coloracion (viraje) con el final de la valoracion.

Otros parámetros utilizados para evaluar la nitidez y exactitud de los indicadores son "Specific Color Discrimination" (SCD), y "color difference" (ΔE^*) propuestos por BHUCHAR en 1982 (132) la expresion matematica de ΔE^* es :

$$\Delta E^* = \left| (L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2 \right|^{1/2}$$

La diferencia de color, es pues la distancia geométrica entre dos puntos que representan dichos colores en el espacio de color.

La utilización conjunta de los parámetros (J y ΔE^*) permite una mejor evaluación de las transiciones de color de los indicadores.

Otro concepto importante a tener en cuenta es el denominado "punto gris" llamado también de igual energía y que es el punto central del diagrama de cromaticidad, sus coordenadas son $x = 0.3101$ e $y = 0.3163$ (las líneas rectas que lo atraviesan unen puntos complementarios). Dicho de otro modo, el punto gris representa la situación del sistema antes de la adición de cualquier colorante y utilizando como fuente de radiación el standard C.

De lo expuesto se deduce que puede ser una buena medida de la calidad de la transición, su proximidad o lejanía del punto gris. Aquellos indicadores que incluyen el punto gris en su transición o bien pasan muy cerca de él, ofrecen cambios de coloración muy nítidos.

Esta idea abre una línea de investigación, consistente en buscar los colorantes inertes adecuados para hacer coincidir el punto final de la valoración en el punto gris. Es decir, una vez fijada la transición cromática del viraje de un determinado indicador, mediante la adición de uno o varios colorantes, se despla-

za dicha curva de transición hasta hacerla pasar por el punto gris; con lo cual el viraje que percibe el observador es el siguiente: color A - incoloro - color B. Se elimina así el intervalo suma de los colores A - B, evitando los errores inherentes a todo proceso de valoración, al mismo tiempo que mejora la comodidad y rapidez de la determinación.

El estudio y evaluación de la calidad de estos indicadores, conocidos con el nombre de "indicadores mixtos", se realiza con los mismos sistemas de cálculo y diagramas explicados anteriormente.

La aplicación de la teoría del color a la química analítica es reciente, existiendo pocos trabajos al respecto en la bibliografía consultada. Se han publicado algunos artículos que hacen referencia al estudio cromático de indicadores (exclusivamente ácido-base y metalocrómicos) así como a la elaboración de indicadores mixtos de punto gris (133) (134) (135) (136) (137). Tan solo unos pocos hacen referencia a valoraciones de productos de utilización en farmacia, valoraciones que suelen transcurrir en medios no acuosos.

Bakos y Col. (138) correlacionan la cantidad de ácido ascórbico en escaramujos con los valores tristímulo calculados colorimétricamente.

Inagaki y Col. (139) determinan drogas que poseen en su estructura dobles enlaces por espectroscopía IR utilizando la "complementary tristimulus colorimetry".



Yoshida, Oda y Hirose determinan barbital y fenobarbital sodicos (141), teofilina (140) y glicina (140) (141) en disoluciones acéticas cuya concentración varia de 10^{-2} a 10^{-4} M, mediante valoración con ácido perclórico en medio acético glacial, utilizando violeta cristal como indicador (en el caso de la glicina tambien utilizan α - naftolbenzeina). Calculan la concentración de analito a partir de una expresion teórica que relaciona la transición de color ϕ (definida como la relacion entre la concentración libre y la concentración local de indicador), las constantes condicionales analito - valorante e indicador-valorante, y las concentraciones iniciales de indicador y valorante, evitando así el error inherente al indicador. Los valores de ϕ y de las constantes condicionales los obtienen a partir "complementary tristimulus colorimetry" midiendo la absorbancias entre rangos del espectro correspondiente, que coinciden con los tres maximos observados. Construyen curvas teoricas $C_{val.} / C_{anal.} = F(\phi, \text{ constantes condicionales, } C_{ind.}, C_{anal.})$ frente a ϕ , haciendo variar este entre 0 y 1. Los resultados experimentales obtenidos reproducen las curvas teoricas.

I.1.4.- ANALISIS POR INYECCION EN FLUJO DE MEDICAMENTOS.

La necesidad de automatizacion en el analisis de control ha inducido al desarrollo de métodos que trabajen en flujo ya sea continua o discontinuamente. En esta linea y dentro del primer grupo se encuadra el análisis de Inyección en Flujo (FIA), método

propuesto recientemente y consolidado como una nueva metodología científica.

Esta basado en la inyección y dispersión controlada (mezclado) de la muestra, en una corriente no segmentada del reactivo portador y la posterior conducción de la mezcla hacia el detector.

El FIA goza además de la versatilidad de los métodos en flujo continuo de ventajas adicionales: diseño simple y barato siendo a la vez lo suficientemente robusto para ser utilizado diariamente en un laboratorio analítico.

Los trabajos publicados al respecto son unos quinientos, siendo relativamente pocos los que hacen referencia al área farmacéutica 4,5% (142) o 13,7% (143). Los artículos dentro de este campo han sido recientemente revisados (144) y se pueden clasificar, atendiendo a los métodos instrumentales y técnicas empleadas, en los siguientes apartados:

1.- Absorción de radiación.

Espectroscopia UV-V

La determinación de la hidrazida del ácido isonicotínico en tabletas (145) se basa en el desarrollo de dos reacciones competitivas; en la primera se forma un complejo coloreado entre la isoniazida y V(V) en medio fosfórico y la segunda en una oxidación del complejo por la acción del VO_3^- . La relación de velocidades de reacción es adecuada para obtener una señal cuya altura es directamente proporcional a la cantidad de isoniazida inyecta

da. Los valores de absorbancia se leen a 420 nm . Glucosa, ácido cítrico, oxálico, fructosa y dextrina no interfieren aún en un exceso de cien veces en muestras de 0,3 ml que contienen 25 microgramos de isoniacida. El análisis de los comprimidos se realiza por interpolación directa en la curva de calibrado y por "adición standard".

Landis (146) propone un método FIA para cuantificar doce esteroides diferentes basado, en la reducción del azul de tetrazolio por el analito en medio básico y dando un formazan coloreado. Ha sido descrito para el acetato de metilprednisolona, siendo el rango de linealidad 0,073-0,914 mg/ml y la rsd 0,5%.

Muchos de los trabajos FIA que desarrollan determinaciones en el UV-V incluyen extracción líquido-líquido como paso preliminar. En este sentido, Karlberg et al. (147) y Bergamin et al. (148) proponen independientemente un procedimiento FIA de separación, consiguiendo resultados similares a los obtenidos por métodos de extracción convencional.

Un ejemplo que demuestra la necesidad de la extracción líquido-líquido en FIA es la determinación de cafeína en muestras de ácido acetisalicílico (147). La interferencia producida en el reparto por el sulfato de laurilsodio (surfactante que contenían los comprimidos) se elimina con bromuro de tetrametilamonio, éste forma un par iónico con el lauril que se extrae en la fase orgánica y que no absorbe a la longitud de onda de medida (275 nm).

Kalberg et al. (149) determina codeína extrayendola del cloroformo por formación del picrato correspondiente. Las muestras acuosas se inyectan en una corriente acuosa de picrato, tamponadas a $\text{pH} = 6.50$ y segmentadas por una corriente de cloroformo. El rango de linealidad es $(0.5 - 9) \cdot 10^{-4}$; estudian la interferencia producida por el sulfato de laurilsodio.

La determinación del cloruro de Prociclidina se lleva a cabo por Fossey y Cantwell (150), describen y caracterizan un aparato que utiliza un separador de membrana como separador de fases y una presión de bombeo constante. Otras membranas han sido descritas por Hord y Kalberg (151) y Ogata et al (152).

Difenildramina y 8-cloroteofilina son determinadas (153) previa extracción utilizando una doble membrana (teflon-papel); a $\text{pH} 10$ la difenildramina se extrae en la fase orgánica mientras que la 8-cloroteofilina es retenida cuantitativamente en la fase acuosa.

Recientemente se están adecuando a FIA procedimientos controlados por microprocesador, en este sentido, se determinan compuestos fenólicos (tales como el sulfato de terbutalina) por reacción con 4-aminoantipirina y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (154). Batteridge et al. (155) proponen una optimización computo-asistida para el análisis FIA de isoprenalina en base a la sensibilidad, con método simplex modificado y procedimientos univariados. En esta línea también publica Wade (156).

Así mismo, también se proponen determinaciones de drogas con enzimas inmovilizados y lecturas espectrofotométricas (157) (158),

ambos trabajos se comentan en el apartado de metodos enzimáticos.

2.- Emission de radiacion.

Fluorescencia, fosforescencia y quimioluminescencia.

El método de la formación de tiocromo a partir de tiamina (vitamina B₁), que se aplica a la determinacion de esta en preparados farmaceuticos, ha sido aplicado a FIA (159), esta basado en la reaccion de la vitamina B₁ y el Fe(CN)₆³⁻ en medio basico y extracción del tiocromo formado en la fase organica.

Dullari et al. (160) estudian las interacciones binding droga-proteína fluorimétricamente, siendo los resultados obtenidos similares a los correspondientes a un procedimiento estático.

J.N. Miller (161) recopila los resultados obtenidos en su laboratorio que desarrollan procedimientos que combinan inyección en flujo y métodos luminiscentes. Inyectan el analito (quinina, glicina, ...) en una corriente alcalina para convertirlo en una especie fluorescente.

Burguera, Burguera y Towshend (162) publican un review que hace referencia a los principios, aplicaciones y líneas FIA para reacciones de quimioluminescencia monitorizadas, tambien determinan H₂O₂ con un limite de detección de 0,003 ng/ml.

La extinción de la fosforescencia en el caso del biacetilo en fase líquida a temperatura ambiente (163) se presenta como una técnica de detección de algunos compuestos orgánicos en sistemas FIA, desarrollandose para sustancias que contengan sulfuros.

3.- Corriente eléctrica.

Voltametría y polarografía.

El analgésico fenólico meptazinol se determinó por oxidación electroquímica, con una célula de detección voltamétrica carbon-vidrio (164). Las muestras fueron inyectadas en una corriente del electrolito soporte y la corriente anódica se monitorizó según las muestras fueran pasando por la superficie del electrodo, siendo oxidado el despolarizador al potencial aplicado.

Forsman y Karlsson (165) evalúan polarográficamente con electrodo de gotas de Hg el ácido peniciloico que se encuentra como impureza en la penicilina. El procedimiento FIA presenta una ventaja sobre el convencional y es que el sistema no necesita desaireación debido al efecto del triton X-100 que desplaza la onda de reducción del O_2 -400 mV.

La determinación polarográfica del dinitrato de isosorbida se ha realizado en FIA (166). El detector puede operar como un electrodo de gotas de Hg o de gotas suspendidas, la altura de los picos depende de la presencia de agentes tensioactivos.

Vang y Freiha proponen una detección voltamétrica basada en la preconcentración adsorptiva del analito, resultando más selectiva que la amperometría convencional. Se aplica la determinación de clorpromazina en orina humana (167). No interfieren especies de semejante potencial redox, tales como el ferrocianuro y el ácido ascórbico.

La clorpromazina se determina también junto con fenol, acetaminofen, norepinefrina y algunos iones metálicos por otro autor (168); el método se basa en el registro de los voltamperogramas mientras la muestra y la solución portadora fluyen a través de la celda, tomando la diferencia como la respuesta neta de la muestra.

El ácido cafeico, paracetamol, dopamina y ferrocianuro se cuantifican en FIA (169), el trabajo propone una nueva forma de celda de flujo, en la que introducen un agitador que se coloca al lado de un electrodo tubular poroso con lo que se consiguen velocidades altas y transporte de masa a lo largo de su área superficial.

Amperometría y culometría.

Se ha descrito una celda doble electroquímica para la determinación de cisteína, cistina y penicilamina que utiliza corrientes de flujo acuosas (170), y electrodo de polvo de plata amalgamado que reduce la cisteína, evaluándose este amperométricamente con electrodo de Hg.

Algunos trabajos proponen otro electrodo de trabajo, el constituido por carbon-vidrio reticulado para culometrías y amperometrías en FIA, permitiendo determinar: ácido ascórbico, epinefrina y α -dihidroxifenilalanina en cantidades de nanogramos (171). La mayor ventaja del método es la electrolisis total del analito lo que implica la no realización de curvas de calibrado. Otro trabajo (172) utiliza el mencionado electrodo y determina

amoxicilina, hidroquinodopamina y epinefrina.

El H_2O_2 puede evaluarse cuantitativamente por amperometría y FIA con electrodo de carbono (173), el trabajo estudia las interferencias causadas por glicerol, dihidroxiacetona y los componentes del tampón.

La determinación amperométrica de glucosa en muestras de suero propuesta por Yao (174) utiliza electrodo de membrana constituido por un enzima modificado químicamente, también diseña una nueva celda de flujo; la muestra se inyecta en la corriente del portador (pH 7.5 , tampon fosfato) y pasa a través de una columna empaquetada con gel de sílice y ditiocarbamato de Cu (II) para eliminar impurezas. Este mismo autor (175) determina fosfolípidos en muestras de suero con un procedimiento semejante al descrito.

4.- Potencial eléctrico.

Potenciometría.

Agentes reductores, tales como el ácido ascórbico, fueron inyectados en una corriente no segmentada de Ce(IV) y cuantificados a partir de la relación de concentraciones de Ce(III) y Ce(IV) utilizando electrodos de Pt y grafito (176), la reproducibilidad obtenida es buena.

Yusuda (177) determina glucosa con electrodo de urea formado por un electrodo selectivo de NH_4^+ con una membrana de urea sa immobilizada.

Pungor (178) ha publicado un reviews sobre procedimientos electroanalíticos en FIA aplicados al análisis de productos farmacéuticos.

5.- Metodos enzimáticos.

Pacakova et al. (157) determinan glucosa y pirocatecol con dos enzimas, glucosa oxidasa y tiposinasa, inmovilizados en la superficie del sensor o en un soporte inerte empaquetado en una pre columna.

Un método original para determinación de β -lactamas (penicilinas y cefalosporinas) que consiste, en la medida de entalpía de reacciones enzimáticas en FIA por medio de termistores, ha sido publicado (150).

El alto costo de los enzimas y co-enzimas justifica los esfuerzos de recuperación, en esta línea, se ha descrito una determinación rápida de glucosa con regeneración automática y reciclamiento del NAD^+ y de la glucosa-dihidrogenasa (179). Este estudio está basado en un trabajo anterior de Hansen et al.

I. 2.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

I.2.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

Se inició la presente Tesis Doctoral dentro de la línea de investigación de este Departamento "Estudios químico-analíticos de las biguanidas", y más concretamente con el fin de proponer métodos de análisis de biguanidas utilizadas en el mercado farmacéutico español. Para ello se tuvo en cuenta que la totalidad de métodos de análisis recomendados en las Farmacopeas más utilizadas (British Pharmacopoeia y United States Pharmacopoeia) emplean técnicas clásicas e instrumental fácilmente accesible a cualquier laboratorio.

Con estas premisas en esta Memoria se propone la valoración conductimétrica de biguanidas contenidas en medicamentos, utilizando sales de Cu(II) como valorante. El método propuesto es ventajoso frente al método standard (valoración con HClO_4 en medio acético glacial) en su ejecución y especialmente en cuanto a su selectividad. La exactitud y reproducibilidad son similares a las correspondientes al método standard.

La realización de este apartado va precedida del estudio químico de un sistema Cu(II) - Biguanida inédito. Dado que se utiliza la 2-sulfoetilbiguanida, recientemente preparada en este Departamento, se necesitó determinar las constantes de acidez de la misma.

En segundo lugar se realiza un estudio crítico-comparativo de las transiciones de color propuestas en las Farmacopeas para la valoración de biguanidas. Dicho estudio utiliza las teorías de cromaticidad aplicadas a la Química Analítica y permite demos-

trar fundadamente (no solo empíricamente) cuales son los indicadores más adecuados; también se mejoran los resultados que se obtienen con los indicadores simples que resultan más favorables, proponiéndose indicadores mixtos de punto gris

Por último, se acortan sensiblemente y mejoran los procedimientos extracto-colorimétricos propuestos para la determinación de Clorhexidina, con la utilización de agentes tensioactivos. Estos procedimientos se han desarrollado recientemente y de forma empírica sin ningún estudio químico del sistema implicado. En esta Memoria se utilizan los agentes surfactantes para la puesta a punto del método espectrofotométrico directo y con técnicas FIA, caracterizándose previamente los productos obtenidos en la reacción.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

INDICE DE TABLAS

ANTECEDENTES

- 1.- Observador standard CIE 1931.....37
- 2.- Coordenadas de cromaticidad de los colores del espectro.....40
- 3.- Distintos sistemas de coordenadas cromáticas.....43

CONSTANTES DE ACIDEZ DE LA 2-SULFOETILBIGUANIDA

- 4.- Analisis elemental de la 2-sulfoetilbiguanida.....77
- 5.- Valores de Absorbancia a 232 nm para distintos pH.....83
- 6.- Aplicación del método de los promedios para la determinación del pKa2.....85
- 7.- Calibrado de los electrodos (Método de Gran).....89
- 8.- Aplicación del método de Speakman para la determinación del pKa3 y pKa2.90
- 9.- Aplicación del método analítico para la determinación del pKa3.91

K_{ps} DE Cu(II) - 2-SULFOETILBIGUANIDA

- 10.- Rectas de calibrado para la determinación de Cu por AA en el sistema Cu(II) - 2-sulfoetilbiguanida - EDTA.....97
- 11.- Determinación de Cu por AA en el sistema Cu(II) - 2-sulfoetilbiguanida - EDTA.98

VALORACIONES CONDUCTIMETRICAS DE BIGUANIDAS

- 12.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de digluconato de clorhexidina con $CuSO_4$ en medio amoniacal.104

13.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con CuSO_4 en medio amoniacal..	106
14.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de digluconato de clorhexidina con CuSO_4	111
15.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con CuSO_4	113
16.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con CuSO_4	115
17.- Influencia del medio en las valoraciones de clorhidrato de proguanil con CuSO_4 en medio amoniacal.....	117
18.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con CuSO_4	119
19.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$	121
20.- Influencia de la concentración de etanol en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina y proguanil con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$.	123
21.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con CuSO_4 en medio amoniacal....	127
22.- (a y b) Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con CuSO_4 en medio amoniacal.	129
23.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con CuSO_4	132
24.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con CuSO_4	134
25.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$	136

26.- Influencia de la concentración en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$	141
27.- Influencia de la concentración en las valoraciones conductimétricas de metformina con CuSO_4	143
28.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $3,02 \cdot 10^{-5}$ M.....	149
29.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $5,76 \cdot 10^{-5}$ M.	149
30.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $1,50 \cdot 10^{-4}$ M.	150
31.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $3,40 \cdot 10^{-4}$ M.....	150
32.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $4,26 \cdot 10^{-4}$ M.	151
33.- Exactitud del método.....	151
34.- Reproducibilidad de los resultados respecto a la Molaridad de clorhidrato de clorhexidina.	152
35.- Reproducibilidad de los resultados respecto al volumen final de valorante.	152
36.- Evaluación del error sistemático.....	153
37.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformina $2,55 \cdot 10^{-4}$ M.	154
38.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformina $4,24 \cdot 10^{-4}$ M.	154
39.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformina $8,49 \cdot 10^{-4}$ M.	155
40.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformina $1,70 \cdot 10^{-3}$ M.	155

41.- Exactitud del método.....	156
42.- Reproducibilidad de los resultados respecto a la Molaridad de metformina	156
43.- Reproducibilidad de los resultados respecto al volumen final de valorante.....	157
44.- Evaluación del error sistemático.....	157
45.- Estudio de interferencias para el clorhidrato de clorhexidina.....	160
46.- Estudio de interferencias para el clorhidrato de metformina.....	160
47.- Determinación de biguanidas en productos farmaceuticos.....	165

ESTUDIOS CROMATICOS SOBRE LA VALORACION DE BIGUANIDAS CON HClO_4 EN MEDIO ACETICO GLACIAL.

48.- Función de distribución CIE para el iluminante C.....	174
49.- Valores triestímulus de la transición del violeta cristal....	183
50.- Valores triestímulus de la transición del violeta de metilo..	184
51.- Valores triestímulus de la transición de color del púrpura de bromocresol.....	185
52.- Valores triestímulus de la transición de color del verde de malaquita.	185
53.- Valores triestímulus de la transición del 0.0 Tropaolin.....	187
54.- Variación de la concentración óptica para el violeta cristal.	191
55.- Variación de la concentración óptica para el violeta de metilo.....	192
56.- Variación de la concentración óptica para el verde de bromocresol.	193

57.- Variación de la concentración óptica para el verde de malaquita.	194
58.- Variación de la concentración óptica para el O.O Tropaolin..	195
59.- Variación de la diferencia de color para el violeta cristal.	197
60.- Variación de la diferencia de color para el violeta de metilo.	198
61.- Variación de la diferencia de color para el púrpura de brocresol.	199
62.- Variación de la diferencia de color para el verde de malaquita.	200
63.- Variación de la diferencia de color para el O.O Tropaolin..	201
64.- Valores triestímulus de la transición de color correspondiente a la mezcla violeta de metilo-amarillo de neozapon..	208
65.- Variación de la concentración óptica para la mezcla verde de metilo - amarillo de neozapon.	209
66.- Variación de la diferencia de color para la mezcla violeta de metilo - amarillo de neozapon.	210
67.- Valores triestímulus de la transición de color correspondiente a la mezcla violeta de metilo - amarillo de neozapon - azul de timol.	211
68.- Variación de la concentración óptica para la mezcla VM - AN - AT.	212
69.- Variación de la diferencia de color para la mezcla VM - AN - AT.	213
70.- Valores triestímulus de la transición de color correspondiente a la mezcla VM - AN -AT.	214
71.- Variación de la concentración óptica para la mezcla VM - AN - AT.	215

72.- Variación de la diferencia de color para la mezcla VM - AN - AT.	216
73.- Valoraciones visuales con el indicador de punto gris VM -AN -AT.	222
74.- Valores triestímulus de la transición de color correspondien te a la mezcla Violeta cristal - amarillo de neozapon.....	226
75.- Variación de la concentración óptica de la mezcla VC -AN....	227
76.- Variación de la diferencia de color de la mezcla VC -AN. ...	227
77.- Valores triestímulus de la transición de color correspon diente a la mezcla violeta cristal - amarillo de neozapon- azul de timol.	228
78.- Variación de la concentración óptica correspondiente a la mezcla VC - AN - AT.	229
79.- Variación de la diferencia de color correspondiente a la mezcla VC -AN -AT.	229
80.- Valores triestímulus de la transición de color correspon diente a la mezcla violeta cristal - azul de timol.	230
81.- Variación de la concentración óptica para la mezcla VC - AT.	231
82.- Variación de la diferencia de color para la mezcla VC -AT.	231
83.- Valoraciones visuales con el indicador de punto gris VC - AN -AT.	235
SISTEMA CLORHEXIDINA - VERDE DE BROMOCRESOL - TRITON X-100	
84.- Influencia del pH	248
85.- Influencia de la concentración de triton X-100.	257
86.- Estequiometría del sistema VB - Clorh. en ausencia de triton X-100	265

87.- Curva de saturación (variación de la concentración de verde de bromocresol.	268
88.- Curvas de saturación (variación de la concentración de clorhexidina).	271
89.- Determinación del número de especies absorbentes (serie: variación del verde de bromocresol).	279
90.- Determinación del número de especies absorbentes (serie: variación de la clorhexidina).	280
91.- Método de Asmus.....	287
92.- Ley de Beer. Gráfico de Ringbom.....	294
93.- Reproducibilidad del método.	299
94.- Estudio de especies interferentes.	301
95.- Optimización de variables FIA.....	305
96.- Optimización de variables FIA.....	306
97.- Influencia del pH en la altura de pico.....	317
98.- Influencia de la concentración de verde de bromocresol en la altura de pico.	320
99.- Influencia de la concentración de triton X-100 en la altura de pico.	321
100.- Curva de calibrado.	325

INDICE DE FIGURAS

ANTECEDENTES

- 1.- Valores triestímulus del espectro de colores según el observador standard ICI 1931.38
- 2.- Diagramas de cromaticidad. Triangulo de Maxwell.38
- 3.- Diagrama de cromaticidad. Elipses de MacAdam.....42

CONSTANTES DE ACIDEZ DE LA 2-SULFOETILBIGUANIDA

- 4.- Espectro IR de la 2-sulfoetilbiguanida.....79
- 5.- Espectros UV de la 2-sulfoetilbiguanida a diferentes valores de pH.84
- 6.- Diagrama log C -pH para la 2-sulfoetilbiguanida.....92

VALORACIONES CONDUCTIMÉTRICAS DE BIGUANIDAS

- 7.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de digluconato de clorhexidina con CuSO_4 en medio amoniacal.....105
- 8.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con CuSO_4 en medio amoniacal.....107
- 9.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de digluconato de clorhexidina con CuSO_4112
- 10.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con CuSO_4114
- 11.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con CuSO_4116
- 12.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con CuSO_4 en medio amoniacal.....118
- 13.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con CuSO_4120

14.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$122

15.- Influencia de la concentración de etanol en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina y proguanil con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$.124

16.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con CuSO_4 en medio amoniacal128

17.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con CuSO_4 en medio amoniacal.....131

18.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con CuSO_4133

19.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con CuSO_4135

20.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$137

21.- Influencia de la concentración en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$142

22.- Influencia de la concentración en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformina con CuSO_4144

23.- Determinación conductimétrica de clorhexidina en Híbitane 5%.166

24.- Determinación conductimétrica de clorhidrato de proguanil...166

25.- Determinación conductimétrica de metformina en Glucophage...167

26.- Determinación conductimétrica de moroxidina en Couldina.....167

ESTUDIOS CROMATICOS SOBRE LA VALORACION DE BIGUANIDAS CON HClO_4 EN MEDIO ACETICO GLACIAL

27.- Programa de cálculo para la obtención de los datos cromáticos. 175

28.- Diagrama de flujo.176

29.-	Curvas de transición de color de los indicadores ensayados. Sistema CIE 1931.	188
30.-	Curvas de transición de color de los indicadores ensayados. Sistema CIE 1960.....	189
31.-	Curvas de transición de color de los indicadores ensayados. Sistema CIE L a b 1976.	190
32.-	Variación de la concentración óptica para los distintos indicadores ensayados.	196
33.-	Variación de la diferencia de color para los indicadores ensayados.	202
34.-	Curvas de transición de color de las mezclas Violeta de metilo - colorantes . Sistema CIE 1960.....	217
35.-	Curvas de transición de color de las mezclas violeta de metilo - colorantes. Sistema CIE L a b 1976.....	218
36.-	Variación de la concentración óptica para las mezclas VM - Colorantes.	219
37.-	Variación de la diferencia de color para las mezclas VM - Colorantes.	220
38.-	Curvas de transición de color de las mezclas Violeta Cristal - Colorantes. Sistema CIE L a b 1976.	232
39.-	Variación de la concentración óptica para las mezclas VC - Colorantes.	233
40.-	Variación de la diferencia de color para las mezclas VC - Colorantes.	234

SISTEMA CLORHEXIDINA - VERDE DE BROMOCRESOL - TRITON X-100

41.- Espectros correspondientes a disoluciones naranja de metilo - clorhexidina - emulsogen EL.....	241
42.- Espectros correspondientes a disoluciones acuosas de verde de bromocresol a diferentes valores de pH.....	244
43.- Espectros correspondientes a disoluciones verde de bromocresol - triton X-100 a diferentes valores de pH. ..	245
44.- Curvas $A = f(\text{pH})$ para el verde de bromocresol en medio acuoso y en medio triton X-100.....	246
45.- Espectros correspondientes a disoluciones de clorhexidina - verde de bromocresol - triton X-100 a diferentes valores de pH. (blanco agua).	249
46.- Espectros correspondientes a disoluciones de clorh.-VB- triton X-100 a diferentes valores de pH. (blanco VB- triton X-100.....	250
47.- Influencia del pH.	251
48.- Espectros correspondientes a disoluciones de verde de bromocresol y triton X-100 variable.	253
49.- Espectros correspondientes a disoluciones VB - Clorh. y triton X-100 variable. (blanco agua).....	254
50.- Espectros correspondientes a disoluciones VB - Clorh. y triton X-100 variable. (blanco VB -triton X-100).	255
51.- Influencia de la concentración de triton X-100.....	256
52.- Espectros correspondientes a disoluciones VB - triton X-100 tamponadas a pH 5,35 con distintas soluciones reguladoras.	259

53.- Espectros correspondientes a disoluciones VB - Clorh. - triton X-100 tamponadas a pH 5,35 con distintas soluciones reguladoras. (blanco agua).....	260
54.- Espectros correspondientes a disoluciones VB - Clorh.- triton X-100 tamponadas a pH 5,35 con distintas soluciones reguladoras. (blanco VB - triton X-100).....	261
55.- Estabilidad de las disoluciones.....	263
56.- Estequiometría del sistema VB - Clorh. en ausencia de triton X-100.....	266
57.- Espectros correspondientes a las disoluciones de la curva de saturación (variación de la concentración de VB)..	268
58.- Curva de saturación (variación de la concentración de VB).	269
59.- Espectros correspondientes a las disoluciones de las curvas de saturación (variación de la concentración de clorhexidina).....	272
60.- Idem 59.	273
61.- Idem 59.	274
62.- Curvas de saturación (variación de la concentración de clorhexidina).	275
63.- Determinación del número de especies absorbentes (serie variación del verde de bromocresol).	281
64.- Determinación del número de especies absorbentes (serie variación de la clorhexidina).....	282
65.- Método de Asmus. (1ª serie).....	288
66.- Método de Asmus. (2ª serie).....	289
67.- Ley de Beer.	296
68.- Gráfico de Ringbom.....	297

69.- Diagrama de flujo del sistema FIA para la determinación de clorhexidina.303

70.- Optimización de variables FIA: Influencia en la altura de pico de la velocidad de flujo.307

71.- Picos correspondientes a distintas velocidades de flujo. 309

72.- Idem 71.310

73.- Optimización de variables FIA: Influencia en la altura de pico de la longitud del reactor.312

74.- Picos correspondientes a distintos caminos de reacción. .314

75.- Influencia del pH en la altura de pico.318

76.- Influencia de la concentración de verde de bromocresol en la altura de pico.320

77.- Influencia de la concentración de triton X-100 en la al tura de pico.322

78.- Curvas de calibrado.326

79.- Picos correspondientes a la curva de calibrado.327

80.- Reproducibilidad.328

II.1.- REACTIVOS Y APARATOS

II.1.- REACTIVOS Y APARATOS

Reactivos

- Disoluciones de 2-sulfoetilbiguanida (sintetizada a partir de l-cianoguanidina, taurina, sulfato de cobre y NaOH).
- Disoluciones de digluconato de clorhexidina, preparadas a partir de una solución madre del 20 % donada por ICI FARMA.
- Disoluciones de distintas biguanidas preparadas a partir de los sólidos : clorhidrato de clorhexidina (ICI FARMA), clorhidrato de proguanil (ICI FARMA), clorhidrato de metformina (CEPA) y clorhidrato de moroxidina (FUNK SA). La riqueza de los productos de partida se evalúa mediante valoración con HClO_4 en medio acético glacial, siendo respectivamente 99,30 % (dsr 0,3 %), 99,80 % (dsr 0,4 %) , 99,80 % (dsr 0,4 %) y 99,70 % (dsr 0,4 %).
- EDTA-Na_2 (Merck, R A), la disolución se valora frente a CaCO_3 (Merck, R A).
- Disoluciones de $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ (Merck, R A) , CuSO_4 (Merck, R A) y Cu^0 (Merck, R A) valoradas con EDTA-Na_2 utilizando como indicador murexida.
- Sacarosa (Baker), ácido ascórbico (Merck), benzocaína (Probus) y ácido acetilsalicílico (obtenido a partir de ácido salicílico, Probus, y anhídrido , Baker).
- Disoluciones acéticas de violeta cristal (Merck, para microscopía), violeta de metilo (Grübler, indicador), púrpura de bromocresol (Grübler, indicador), verde de malaquita (Riedel, para microscopía) y O.O Tropaolin (Grübler, indicador). Amarillo de neozapon (BASF) y azul de timol (Grübler, indicador).

- Ftalato ácido de potasio (Merck, R A).
- Disolución acética de Acetato de Hg(II) al 5 % (Merck, R A)
- Disolución de HClO_4 (Panreac, puro) en medio acético glacial valorado potenciométricamente frente a ftalato ácido de potasio.
- Disoluciones de naranja de metilo (Riedel, indicador), azul de timol (Riedel, indicador), verde de bromocresol (Merck, indicador) y púrpura de bromocresol (Gröbler, indicador).
- Disoluciones de agentes tensioactivos de distintas procedencias. Triton X-100 (Probus).
- Disoluciones de ácidos, bases y otros reactivos de diversas calidades.

Aparatos

- Espectrofotómetro Shimadzu U V-240, provisto de cubetas de cuarzo, plástico y vidrio de 1 cm de camino óptico.
- Potenciómetro CRISON 517 provisto de electrodo combinado de vidrio Methrohm EA 120.
- Potenciómetro CRISON 501 provisto con electrodo de vidrio Radiometer G202B y electrodo de calomelanos con metanol saturado en KCl preparado en el laboratorio.
- Autobureta Radiometer ABU 80 con pistón de 2,5 ml.
- Rotavapor BUCHI R110.
- Conductímetro CRISON 522 provisto de celda conductimétrica Metrohm EA-608.
- Bomba de flujo continuo LKB.
- Colorímetro Perkin-Elmer, Goleman 55.
- Unidad de dilución automática Tecator 5020; tubos de reacción y de bomba de la misma procedencia.
- Registrador Unicam 45 AR



II.2.- SISTEMAS Cu(II) - BIGUANIDA

II.2.1.- CONSTANTES DE ACIDEZ DE LA 2-SULFOETILBIGUANIDA

La síntesis y purificación de la 2-sulfoetilbiguanida se realiza de acuerdo con el procedimiento' (44).

Una mezcla homogénea formada por 2.28 g de 1-cianoguanidina, 5.28 g de taurina, 2 g de sulfato de cobre pentahidratado y 20 ml de hidróxido sódico 1.25 N se calienta hasta fusión y se mantiene fundida durante una hora a 130°C agitando periódicamente. Al fundido y en caliente se le añaden 40 ml de agua destilada y 20 ml de NH₃ (c). Se obtiene una disolución azul y un precipitado rosa, este precipitado una vez filtrado y lavado con agua, se disuelve en H₂SO₄ (c). Se añaden unos 10 ml de agua y a través de esta disolución se pasa corriente de SH₂. Una vez separado el precipitado de CuS, sobre la disolución incolora se pasa corriente de N₂, para eliminar el exceso de SH₂ que pueda haber disuelto en la disolución. Se basifica el medio con NH₃ hasta pH aproximadamente 9 y se concentra en vacío y a 60°C hasta reducir su volumen a la tercera parte. La adición de etanol provoca la precipitación de un sólido blanco cristalino. Dicho sólido se purifica mediante recristalización en agua caliente.

Se constata la naturaleza del producto obtenido con la realización de análisis por combustión y la obtención del espectro IR por la técnica de inclusión en KBr.

Los resultados obtenidos en el análisis elemental de la sustancia, se muestran junto con los valores calculados para el reactivo 2-sulfoetilbiguanida en la siguiente tabla:

ANALISIS ELEMENTAL	% C	% H	% N	% S	% O
Valores calculados	22,01	5,54	32,08	14,69	25,66
Valores hallados	22,01	5,22	32,08	14,64	26,07
Error absoluto	-	0,32	0,02	0,05	0,41
Error relativo	-	0,06	6 10 ⁻⁴	3 10 ⁻³	0,02

TABLA 4

El espectro IR del producto obtenido se presenta en la figura 4 y contiene las características que se exponen a continuación:

Una amplia banda, entre 3500 y 2900 cm^{-1} que incluye picos a 3440 cm^{-1} correspondientes a las tensiones O-H del agua de cristalización, a 3380, 3200 y 3120 cm^{-1} correspondientes a las tensiones N-H de los grupos aminos primarios, secundarios e iminos. La posible banda de tensión C-H de los grupos $-\text{CH}_2$ queda incluida en dicha zona, entorno a 3000 cm^{-1} .

El grupo de bandas intensas a 1680-1650, 1620 cm^{-1} se debe a las tensiones C=N de los grupos iminos. Dichas bandas aparecen desplazadas a frecuencias mayores, lo que es de esperar por la influencia de los N unidos al C, indicando con ello la existencia de guanidas.

El pico a 1550 cm^{-1} puede atribuirse a la deformación de los grupos aminos primarios y, en especial, a la flexión de los correspondientes enlaces N-H.

A 1470-1430 cm^{-1} se aprecia la banda de deformación asimétrica de los grupos $-\text{CH}_2-$.

El grupo de picos a 1200, 1180, 1160 y 1020 cm^{-1} es atribuible a las vibraciones de tensión del grupo S=O de la agrupación $-\text{SO}_3\text{H}$. En estas mismas zonas se encontrarán las distintas tensiones C-N y sus acoplamientos.

Aparece una banda débil a 900 cm^{-1} que puede deberse a las vibraciones de tensión S-O de la agrupación $-\text{SO}_3\text{H}$.

A 770 cm^{-1} aparece una banda ancha que puede ser debida a las vibraciones de flexión fuera del plano del grupo N-H de la agrupación amina primaria.

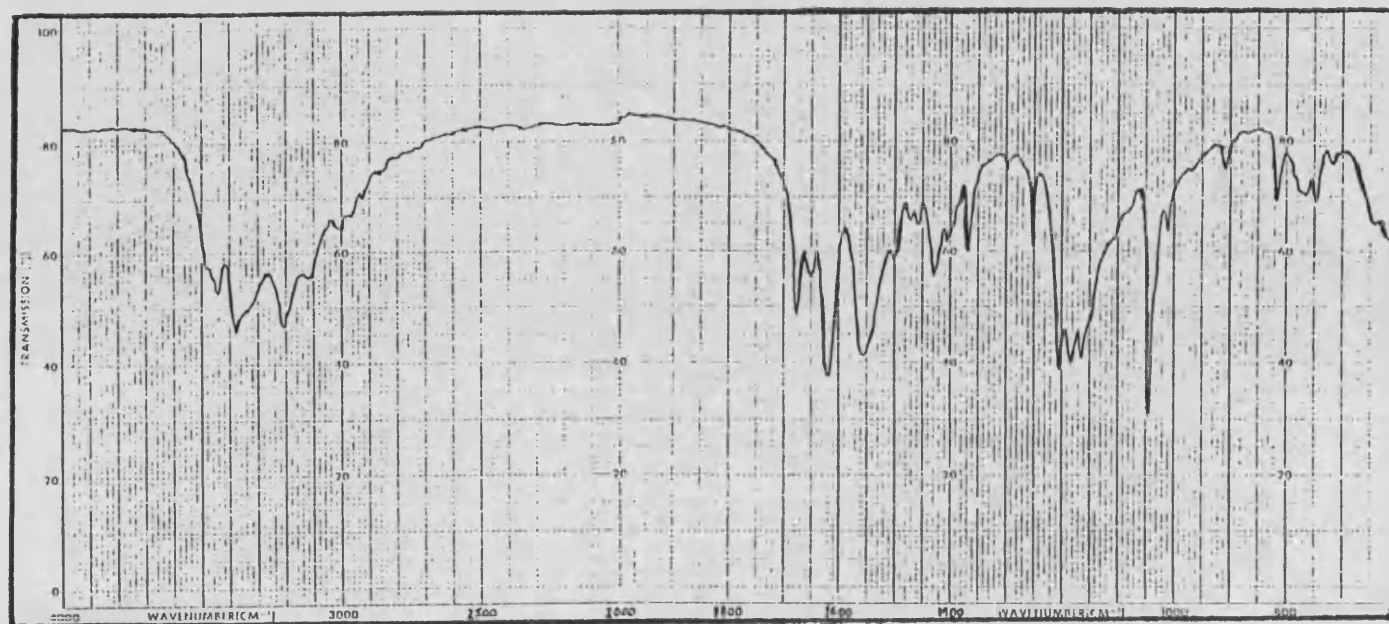
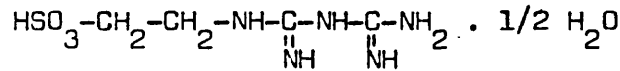


Figura 4.- Espectro IR de la 2-sulfoetilbiguanida

Atendiendo a los resultados expuestos, la formula del reactivo es:



II.2.1.1.-METODO ESPECTROFOTOMETRICO

Método

Se procede a la determinación de las constantes de acidez de la 2-sulfoetilbiguanida, utilizando los cambios observados en los espectros UV-V al variar el pH del medio.

Para ello se preparan diferentes disoluciones del reactivo $4 \cdot 10^{-5}$ M, ajustando el pH a valores diferentes y la fuerza iónica a 0.50 M con KCl. El volumen final de las disoluciones es de 50 ml. Se establecen potenciométricamente los valores de pH y se registran los espectros de absorción a 25°C, leyéndose los valores de absorbancia a 232 nm.

Con los resultados obtenidos se aplica el método de los promedios (180) variante del método de Strentrón-Goldsmith (180). Para su aplicación se requieren los valores de absorbancia de las disoluciones del reactivo a diferentes pH y a una longitud de onda fija, en la que, los coeficientes de extinción de la especie ácida y la básica implicadas en el equilibrio de disociación, sean notablemente distintas:

A partir de la definición de constante de equilibrio:

$$K = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} = \frac{c_{A^-}[H^+]}{c_{HA}} \quad (1)$$

donde: $c = c_{A^-} + c_{HA}$ (2) siendo c la concentración analítica de la 2-sulfoetilbiguanida

$$A = E_1 c_{A^-} + E_2 c_{HA} \quad (b = 1 \text{ cm}) \quad (3)$$

y teniendo en cuenta que:

$$1) \text{ si } c_{HA} = c \quad A_{\text{máx}} = E_2 c \quad (4)$$

$$2) \text{ si } c_{A^-} = c \quad A_{\text{mín}} = E_1 c \quad (5)$$

se obtiene la expresión :

$$K = \frac{A_{\text{máx}} - A}{A - A_{\text{mín}}} \cdot |H^+| \quad (6)$$

tomando logaritmos en la expresión (6) se obtiene:

$$\log K = \log \frac{A_{\text{máx}} - A}{A - A_{\text{mín}}} + \log |H^+| \quad (7)$$

de donde:

$$pK = pH - \log \frac{A_{\text{máx}} - A}{A - A_{\text{mín}}} \quad \text{ó} \quad pK = pH - \log R \quad (8)$$

La expresión (8) para cada valor de pH y A es de la forma :

$$pK_i = pH_i - \log R_i \quad (9)$$

y el valor de pK viene dado por el promedio

$$pK = \frac{\sum pK_i}{n} \quad (10)$$

Resultados

Se presentan los espectros obtenidos en la figura 5 y los valores de la absorbancia a 232 nm en la tabla 5 . Así mismo, los valores de pH y log R se dan en la tabla 6 .

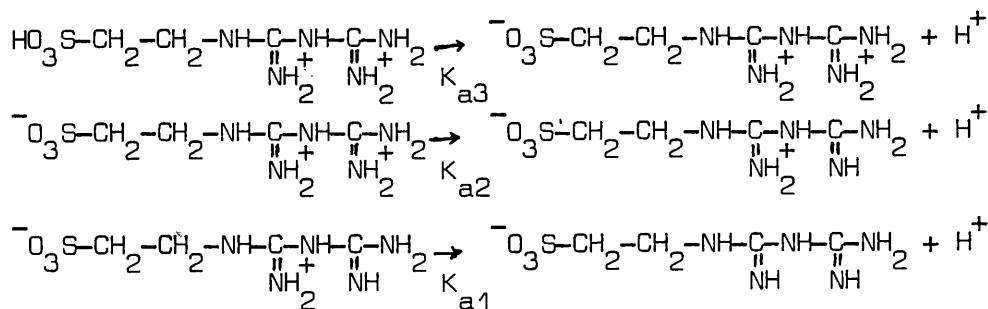
La posición e intensidad de las bandas de absorción que presenta el reactivo en el UV, cambia al variar el pH del medio. En la figura 5 se observa que para el intervalo de pH de 0,242 -

1,550 la 2-sulfoetilbiguanida presenta una banda a 210 nm; entre pH 1,550 - 3,094 aparece una banda a 200 nm y un hombro a 232 nm. Este hombro se convierte en banda en el intervalo de pH que va de 3,206 a 5,204, haciéndose máxima la absorbancia a 232 nm y desapareciendo la banda a 200 nm. Entre pH 8,305 y 12,299 aparece un máximo a 232 nm y una banda de máximo variable alrededor de 200 nm.

Este comportamiento confirma, a grosso modo, el carácter dibásico de las biguanidas con valores de pK que oscilan entre 2-3 y 10-12.

También reflejan los espectros la presencia de otra disociación ácido-base, debida al grupo $-SO_3H$ de la 2-sulfoetilbiguanida con un valor de pK_a inferior a 1,55.

Los equilibrios de disociación ácido-base de la 2-sulfoetilbiguanida, deducidos de la observación de las experiencias precedentes son:



Debido a las características espectrales observadas y con los valores de absorbancia leídos a 232 nm, únicamente se puede obtener el pK_a correspondiente a la segunda protonación del grupo biguanida (pK_{a2}). Aplicando las ecuaciones (9) y (10) se propone el valor de $3,2 \pm 0,2$ para dicha constante.

v(ml) de HCl 0,926 M	v(ml) de KCl 0.926 M	A(25°C, 232 nm)	pH
27,0	-	0,028	0,242
23,0	4,0	0,028	0,335
21,0	6,0	0,026	0,438
17,0	10,0	0,026	0,532
11,0	16,0	0,026	0,752
9,0	18,0	0,026	0,845
7,0	20,0	0,026	0,958
5,0	22,0	0,030	1,103
3,0	24,0	0,033	1,325

v(ml) de NaHSO ₄ 0,500 M	v(ml) Na ₂ SO ₄ 1.000 M	A(25°C, 232 nm)	pH
9,1	13,2	0,040	1,641
3,6	15,2	0,060	2,085
2,1	15,8	0,079	2,326
1,3	16,1	0,102	2,547
0,95	16,3	0,125	2,688
0,70	16,4	0,156	2,830
0,50	16,4	0,226	3,094

v(ml) de HAcO 1,000 M	v(ml) de NaAcO 1,000 M	v(ml) de KCl 1,000 M	A(25°C, 232nm)	pH
1,00	-	25,0	0,347	3,206
0,50	-	25,0	0,379	3,366
5,0	0,30	24,7	0,393	3,400
5,0	0,43	24,6	0,435	3,550
5,0	0,54	24,5	0,464	3,653
5,0	0,69	24,3	0,489	3,760
5,0	0,87	24,1	0,506	3,851
5,0	1,10	23,9	0,521	3,948
5,0	1,75	23,3	0,545	4,157
5,0	2,8	23,3	0,565	4,363
5,0	4,4	22,2	0,575	4,570
5,0	7,0	20,6	0,575	4,780
5,0	11,0	14,0	0,575	4,987
5,0	17,5	7,5	0,575	5,204

Tabla 5.- Valores de absorbancia a distintos pH de la 2-sulfoetilbiguanida.

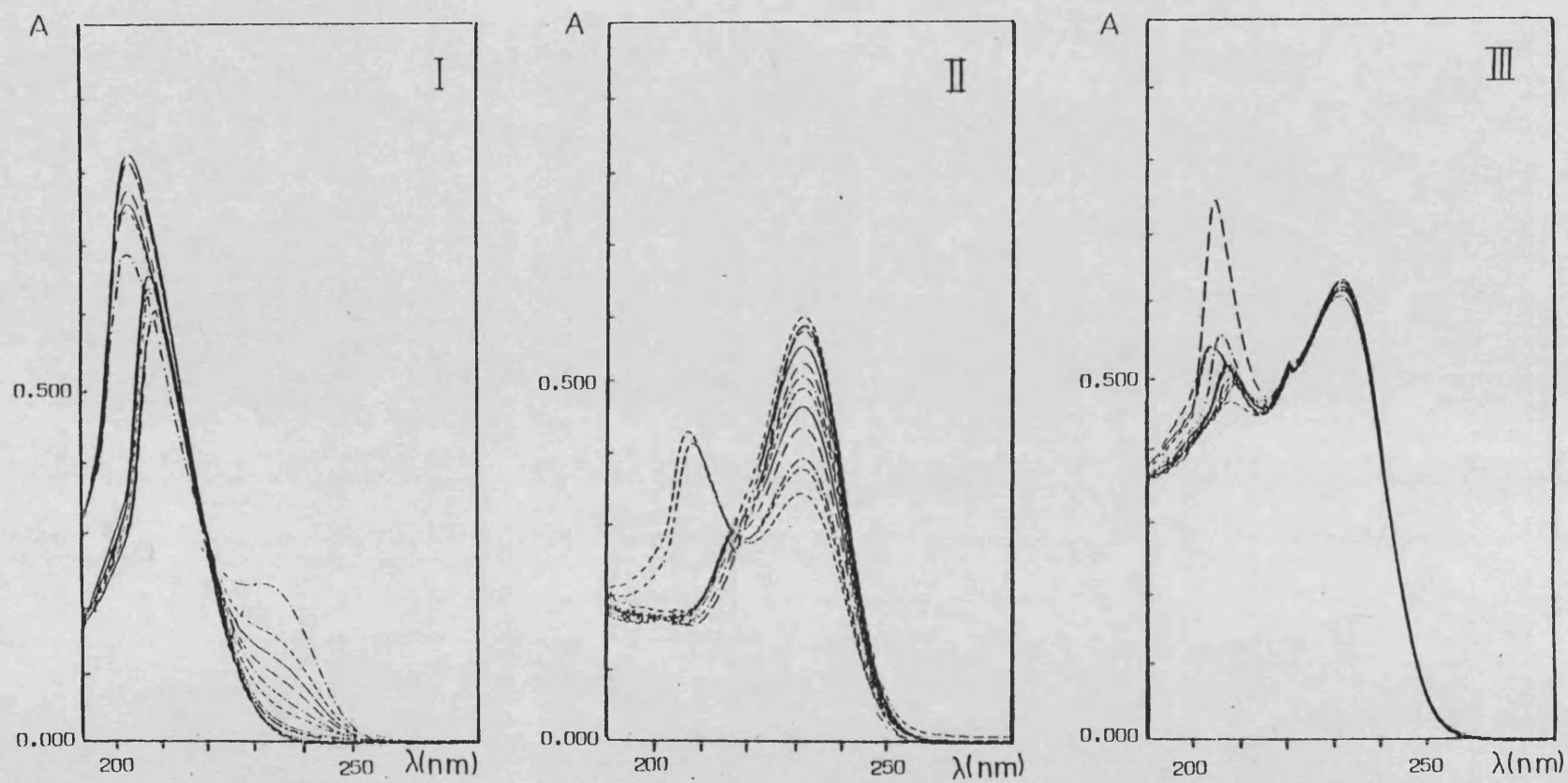


Figura 5.- Espectros UV de la 2-sulfoetilbiguanida a diferentes valores de pH, desde 0.242 a 1.262. (ver tabla 5)

<u>pH</u>	<u>A(232 nm)</u>	<u>log R</u>
1.325	0.033	-1.889
1.641	0.040	-1.582
2.085	0.060	-1.180
2.326	0.079	-0.971
2.547	0.102	-0.794
2.688	0.125	-0.658
2.830	0.156	-0.508
3.094	0.226	-0.242
3.206	0.347	0.149
3.366	0.379	0.256
3.400	0.393	0.305
3.560	0.435	0.466
3.653	0.464	0.596
3.760	0.489	0.731
3.851	0.506	0.842
3.948	0.521	0.962
4.157	0.545	1.238

Tabla 6.- Aplicación del método de los promedios para la determinación del pKa2 de la 2-sulfoetilbiguanida.

II.2.1.2.- METODO POTENCIOMETRICO

Método

Se procede a la determinación de las constantes de acidez de la 2-sulfoetilbiguanida, por la valoración con hidróxido potásico, de una disolución de biguanida con ácido clorhídrico. Se miden los valores de potencial después de la adición de pequeños incrementos del valorante. La disolución a valorar se mantiene termostataada con corriente de agua en una celda termostataada.

Previamente se procede al calibrado de los electrodos mediante el método de Gran (180), valorándose 20 ml de HCl 0,0598 M (I = 0.500 M en KCl) con KOH 0,4984 M (I = 0,500 M en KCl).

Las valoraciones potenciométricas se llevan a cabo a $21,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sobre 20 ml $6,0322 \cdot 10^{-3}$ M en biguanida y 0,0598 M en HCl (I=0,500 M en KCl) utilizando como valorante KOH 0,5000 M. Parte del ácido es consumido en la segunda protonación del grupo biguanida y protonación del grupo $-\text{SO}_3\text{H}$, utilizándose el exceso restante en el calibrado "in situ" de los electrodos.

A los resultados obtenidos en las citadas valoraciones se aplican diferentes métodos de cálculo, que han diferido según que los diversos equilibrios de disociación se considere que tuviesen lugar de forma simultánea ó independientemente.

Equilibrios independientes:

Se aplica el método analítico (180), el valor de pK viene por la siguiente expresión:

$$pK = pH + \log \frac{HA}{A^-} \quad (11)$$

$$pK = pH + \log \frac{v_o(H_o + A_o) - H_t v_t + (v_o + v_t)(K_w/h - h)}{H_t v_t - H_o v_o + (v_o + v_t)(h - K_w/h)} \quad (12)$$

siendo:

- v_0 .-volumen inicial
- v_T .-volumen añadido de base
- H_T .-concentración añadida de base
- A_0 .-concentración de soluto
- H_0 .-concentración de ácido fuerte

Equilibrios simultáneos:

Se aplica el método de Speakman (181), que considera además de las constantes correspondientes a los dos equilibrios involucrados, una función \bar{n} , que indica la razón de protones ligados al anión del ácido respecto a la concentración analítica de dicho ácido:

$$\frac{h^2(2-\bar{n})}{\bar{n}} = K_{a1}K_{a2} - K_{a1} \frac{h(1-\bar{n})}{\bar{n}} \quad (13)$$

Esta expresión puede asemejarse a una recta de pendiente $(-K_1)$ y de ordenada en el origen (K_1K_2) .

Resultados y discusión

El calibrado de los electrodos mediante el método de Gran (tabla 7), ha permitido obtener el valor del producto iónico del agua en las condiciones de trabajo, resultando ser:

$$pK_w = \frac{E^{0'} - E^{0''}}{g} = 13,845 \quad (I = 0,500 M, 21,3^\circ C)$$

que coincide con el de la bibliografía en las condiciones de trabajo. Este calibrado ha permitido comprobar que el potencial de unión líquida del electrodo de referencia, permanece constante durante las valoraciones.

La curva de valoración pH-ml de KOH de la 2-sulfoetilbiguanida está constituida por un único salto, que incluye tanto la valoración

del exceso de HCl como las desprotonaciones correspondientes al grupo sulfóxido y grupos iminos.

Los datos obtenidos en la valoración se dan en las tablas 8 y 9 . Se aplica el método analítico para el cálculo del pK_{a1} , ya que éste corresponde a un equilibrio independiente, según se deduce de las curvas (\bar{n}, pH). Los valores de pK_{a3} y pK_{a2} se encuentran lo suficientemente próximos, como para tener que aplicar necesariamente aquellos métodos que consideran simultáneamente ambos equilibrios de disociación (Método de Speakman).

Los resultados obtenidos para pK_{a3} y pK_{a2} son: 0,85 y 2,97 y para pK_{a1} 11,38 a 21,3°C y fuerza iónica 0,500 M en KCl. Se han realizado dos valoraciones más que conducen a los mismos resultados.

Con estos valores obtenidos se concluye que, en disolución y a pH inferiores a 0,85 predomina la especie diprotonada SBH_3^{2+} , entre pH 0,85 y 2,97 el ión monovalente SBH_2^+ , en el intervalo de pH 2,97 a 11,38 la forma SBH y a pH superiores a 11,38 la especie aniónica SB^- . El correspondiente diagrama logc-pH se representa en la figura 6 .

v_{total} (ml)	E (mV)	$g(E) = v_t \times 10^{E/58,2}$
20,023	332,0	10139032
20,181	330,1	9479032,0
20,459	326,3	8268250,2
20,748	321,9	7045374,4
21,021	317,0	5880154,9
21,240	312,4	4952815,0
21,404	308,3	4243711,0
21,583	303,2	3497307,4
21,768	296,6	2716679,8
21,899	290,7	2164061,7
22,005	284,6	1708266,9
22,105	277,1	1275436,7
22,183	269,5	947555,1
22,250	260,2	657840,2
22,319	245,3	365974,9
22,371	221,8	144771,1
ZONA ACIDA		

v_{total} (ml)	E (mV)	$g(E) = v_t \times 10^{-E/58,2}$
22,439	-203,4	70121,5
22,444	-209,3	90346,5
22,449	-214,7	109698,4
22,454	-218,6	128028,7
22,460	-223,0	152414,0
22,465	-226,5	175089,0
22,470	-229,3	195643,6
22,475	-232,0	217747,9
22,480	-234,2	237602,7
22,485	-236,3	258301,5
22,490	-238,5	281791,3
22,495	-240,4	303857,7
22,497	-241,1	312418,2
ZONA BASICA		

Tabla 7.- Calibrado de los electrodos mediante el método de Gran.

$v(\text{ml})$	h	n	\bar{x}	\bar{y}
0.152	4.810×10^{-2}	1.2477	-9.549×10^{-3}	1.395×10^{-3}
0.195	4.657×10^{-2}	1.2412	-9.128×10^{-3}	1.349×10^{-3}
0.294	4.444×10^{-2}	1.2181	-7.957×10^{-3}	1.258×10^{-3}
0.401	4.171×10^{-2}	1.1962	-6.842×10^{-3}	1.169×10^{-3}
0.536	3.824×10^{-2}	1.1818	-5.882×10^{-3}	1.012×10^{-3}
0.583	3.450×10^{-2}	1.1668	-4.932×10^{-3}	8.499×10^{-4}
0.806	3.150×10^{-2}	1.1393	-3.351×10^{-3}	7.495×10^{-4}
0.945	2.808×10^{-2}	1.1197	-3.002×10^{-3}	6.201×10^{-4}
1.038	2.585×10^{-2}	1.1031	-2.416×10^{-3}	5.431×10^{-4}
1.101	2.436×10^{-2}	1.0889	-1.988×10^{-3}	4.963×10^{-4}
1.242	2.096×10^{-2}	1.0747	-1.457×10^{-3}	3.781×10^{-4}
1.294	1.975×10^{-2}	1.0633	-1.176×10^{-3}	3.436×10^{-4}
1.392	1.747×10^{-2}	1.0452	-7.555×10^{-4}	2.788×10^{-4}
1.487	1.527×10^{-2}	1.0293	-4.347×10^{-4}	2.199×10^{-4}
1.562	1.356×10^{-2}	1.0144	-1.925×10^{-4}	1.787×10^{-4}
1.621	1.224×10^{-2}	1.0009	-1.100×10^{-5}	1.494×10^{-4}
1.663	1.131×10^{-2}	0.9897	1.177×10^{-4}	1.305×10^{-4}
1.715	1.040×10^{-2}	0.9754	2.562×10^{-4}	1.084×10^{-4}
1.766	9.058×10^{-3}	0.9584	3.932×10^{-4}	8.918×10^{-5}
1.828	7.702×10^{-3}	0.9422	4.725×10^{-4}	6.660×10^{-5}
1.855	7.144×10^{-3}	0.9297	5.402×10^{-4}	5.876×10^{-5}
1.904	6.123×10^{-3}	0.9091	6.122×10^{-4}	4.498×10^{-5}
1.969	4.848×10^{-3}	0.8686	7.334×10^{-4}	3.061×10^{-5}
2.005	4.139×10^{-3}	0.8473	7.458×10^{-4}	2.330×10^{-5}
2.033	3.632×10^{-3}	0.8228	7.822×10^{-4}	1.887×10^{-5}
2.054	3.251×10^{-3}	0.8048	7.885×10^{-4}	1.570×10^{-5}
2.096	2.554×10^{-3}	0.7573	8.185×10^{-4}	1.070×10^{-5}
2.133	1.998×10^{-3}	0.7051	8.358×10^{-4}	7.334×10^{-6}
2.158	1.666×10^{-3}	0.6621	8.502×10^{-4}	5.608×10^{-6}

$$Y = 1.511 \times 10^{-4} - 1.414 \times 10^{-1} X \quad (r=0.9990)$$

Tabla 8.- Aplicación del método de Speakman para la determinación del pKa1 y pKa2 de la 2-sulfoetilbiguanida.

<u>v(ml)</u>	<u>ah</u>	<u>pK=log R + pH</u>
2.473	7.794×10^{-4}	11.36
2.479	8.536×10^{-4}	11.37
2.484	9.023×10^{-4}	11.36
2.489	9.688×10^{-4}	11.37
2.494	1.036×10^{-3}	11.38
2.499	1.099×10^{-3}	11.38
2.503	1.153×10^{-3}	11.39
2.507	1.209×10^{-3}	11.40
2.512	1.263×10^{-3}	11.39
2.518	1.324×10^{-3}	11.38

Tabla 9.- Aplicación del método analítico para la determinación del pKa3 de la 2-sulfoetilbiguanida.

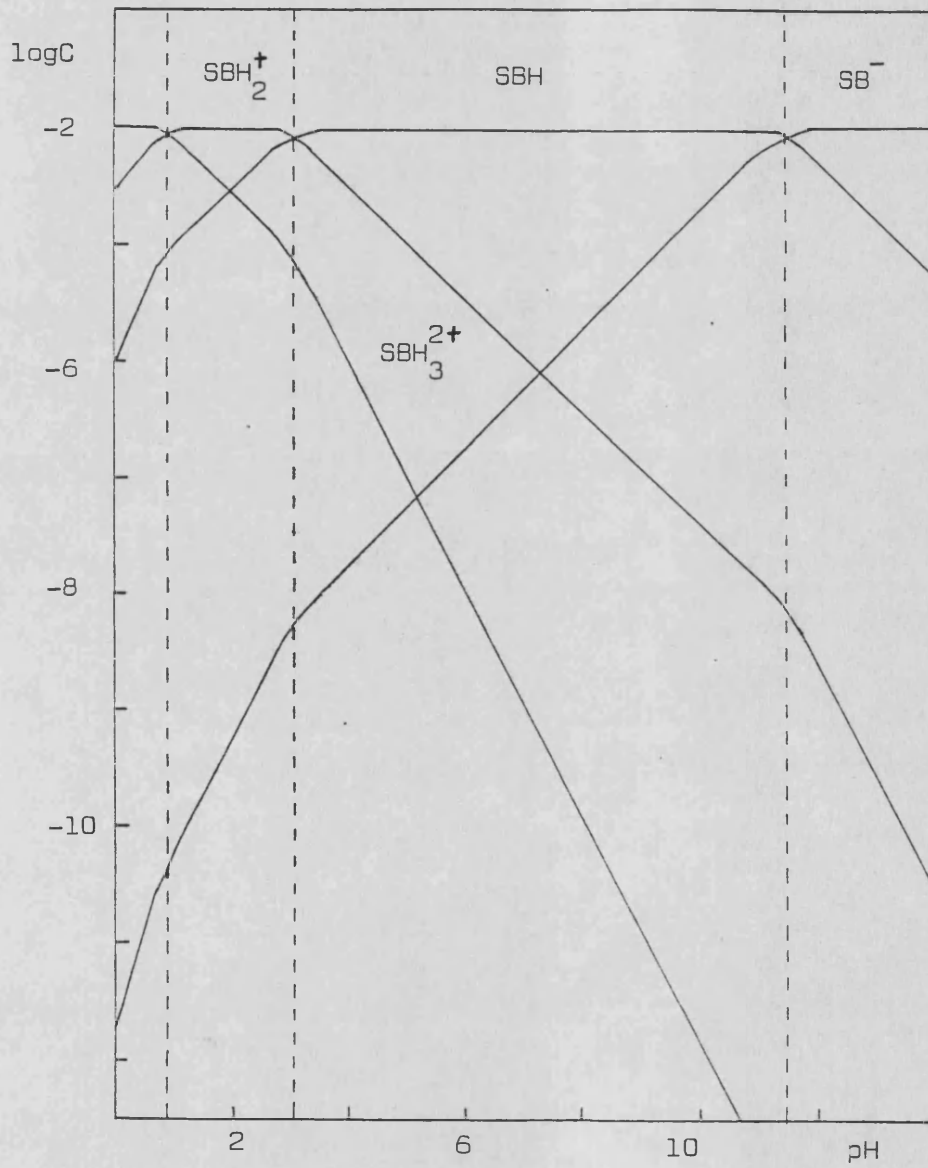


Figura 6.- Diagrama logC-pH para la 2-sulfoetilbiguanida.

II.2.2.- K_{ps} DE Cu(II) - 2-SULFOETILBIGUANIDA

La adición de la 2-sulfoetilbiguanida a una disolución de Cu(II) da lugar a la formación, de un sólido de color rosa si el pH está comprendido entre los valores 4,3 y 12,4. A valores superiores de pH, dicho sólido desaparece dejando una disolución de color rosa.

El análisis del precipitado rosa revela que su fórmula más probable es $Cu(C_4N_5H_{10}SO_3)_2 \cdot 2H_2O$, con el átomo de cobre enlazado al grupo biguanida por los grupos iminos. Este precipitado si se somete a calefacción no pierde peso hasta alcanzados los 84°C, donde tiene lugar la deshidratación. La forma anhidra es estable hasta unos 260°C, donde comienza la destrucción del ligando dejando un residuo formado mayoritariamente por Cu_2O .

La aplicación de la conductimetría a disoluciones de Cu(II) valoradas con 2-sulfoetilbiguanida, en medio amoniacal, da una estequiometría 1:2 para el complejo, estequiometría que se corrobora mediante la realización de una valoración espectrofotométrica de la biguanida, no consumida por el Cu(II) y que queda en la disolución sobrenadante (44).

Método

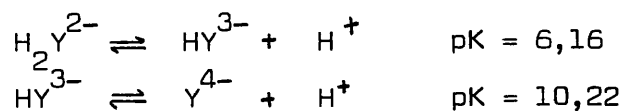
El cálculo del producto de solubilidad del precipitado Cu(II) -2-sulfoetilbiguanida se ha llevado a cabo mediante la utilización del método de solubilidad (180); procedimiento indirecto que consiste en suspender el precipitado en una disolución que contiene un agente complejante del catión, determinándose el contenido en Cu(II) de la disolución sobrenadante periódicamente, hasta la obtención de un valor de concentración constante para tiempos sucesivos.

Se ha utilizado como agente complejante del Cu(II) la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (Na_2YH_2), por formar un

complejo de estabilidad alta. Las condiciones de acidez del medio son las adecuadas, para que la concentración de ión metálico presente en solución sea la conveniente para su posterior medida cuantitativa, realizada por espectroscopía de Absorción Atómica.

Para ajustar el pH del medio se utiliza el tampón $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($\text{pH}=8,850$), la concentración de Na_2YH_2 es $1,769 \cdot 10^{-2}$ M y la fuerza iónica del medio se calcula del siguiente modo:

Los equilibrios a tener en cuenta para la especie AEDT son :



Luego

$$[\text{Y}^{4-}] = \frac{0,01769}{1 + \frac{h}{10^{-10,22}} + \frac{h^2}{10^{-16,38}}} \quad (14)$$

$$[\text{HY}^{3-}] = \frac{[\text{Y}^{4-}] h}{10^{-10,22}} \quad (15)$$

$$[\text{H}_2\text{Y}^{2-}] = \frac{[\text{HY}^{3-}] h}{10^{-6,16}} \quad (16)$$

La concentración de la especie amonio vendrá dada por la expresión

$$[\text{NH}_4^+] = \frac{0,06923}{1 + \frac{3,981 \cdot 10^{-10}}{h}} \quad (17)$$

La fuerza iónica del medio se calcula a partir de la expresión:

$$I = 1/2 (2[\text{Na}^+] + [\text{Cl}^-] + [\text{NH}_4^+] + 16[\text{Y}^{4-}] + 9[\text{HY}^{3-}] + 4[\text{H}_2\text{Y}^{2-}] + [\text{OH}^-]) \quad (18)$$

Las experiencias se han realizado termostatando a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y con agitación constante. Se determina la concentración de $\text{Cu}(\text{II})$ de la disolución por Absorción atómica (tomando una alícuota de

la suspensión, centrifugando y pipeteando dos ml de la solución sobrenadante, que se diluyen convenientemente) cada cierto periodo de tiempo, 1-48 horas, hasta llegar a una concentración constante, lo que indica que se ha alcanzado el equilibrio en el sistema Cu(II) - 2-sulfoetilbiguanida - AEDT.

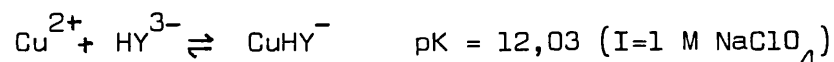
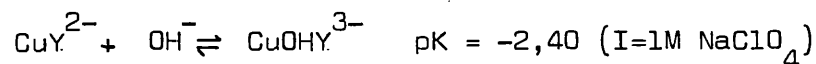
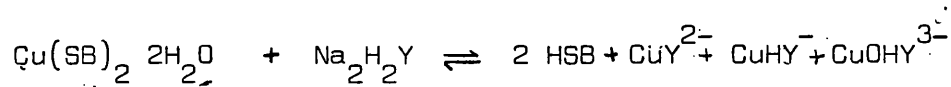
Los patrones para absorción atómica se preparan partiendo de la misma concentración de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$, NH_3 y NH_4Cl , y realizando las mismas diluciones a las que se someten las muestras problemas.

Resultados

La fuerza iónica del medio, calculada con los valores de las expresiones (14), (15), (16), (17) y sustituidas en la (18), da un valor de 0,133 M, para unas concentraciones iniciales de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ 0,0177 M, NH_4Cl 0,0127 M y NH_3 0,0565 M.

Los resultados obtenidos se dan en las tablas 10 y 11 . De las experiencias realizadas se deduce que el sistema alcanza el equilibrio a las 43 horas y que la concentración de Cu(II) que existe en la solución es de $1,036 \cdot 10^{-2}$ M.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los siguientes equilibrios a considerar a pH 8,850 :



y teniendo presente el siguiente esquema :

	$\text{Cu(SB)}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	AEDT libre	HSB	Cu(II) en solución
c_i	0,0177	0,0177	-	-
c_e	0,0177-c	0,0177-c	2c	c

se puede plantear el siguiente desarrollo:

$$|\text{Cu}^{2+}| + |\text{CuY}^{2-}| + |\text{CuHY}^{-}| + |\text{CuOHY}^{3-}| = c$$

luego

$$|\text{Cu}^{2+}| = \frac{c}{1 + |Y^{4-}| \left(\frac{1}{10^{-18,8}} + \frac{h}{10^{-22,3}} + \frac{0h^{-}}{10^{-21,2}} \right)} \quad (19)$$

y teniendo presente que

$$0,0177 - c = |H_4Y| + |H_3Y^{-}| + |H_2Y^{2-}| + |H_3Y^{-}| + |Y^{4-}|$$

$$|Y^{4-}| = \frac{0,0177 - c}{1 + \frac{h}{10^{-10,2}} + \frac{h^2}{10^{-16,4}} + \frac{h^3}{10^{-19,1}} + \frac{h^4}{10^{-21,0}}}$$

y siendo los equilibrios de la 2-sulfoetilbiguanida los señalados en el apartado anterior, la concentración de ésta vendrá dada por la siguiente expresión :

$$|\text{HSB}| = \frac{2c}{\frac{10^{-11,38}}{h} + 1 + \frac{h}{10^{-2,97}} + \frac{h^2}{10^{-2,97} \cdot 10^{-0,85}}} \quad (20)$$

$$\text{y cómo } K_{ps} = |\text{Cu}^{2+}| |\text{HSB}|^2 \quad (21)$$

Sustituyendo en (21), (20) y (19) para un valor de pH de 8,850 y una concentración de Cu(II) de $1,036 \cdot 10^{-2}$ M, obtenemos un valor de pKs de 20,62 para una fuerza iónica de 0,133 M.

A) Recta de calibrado : dilución 1/25

<u>ppm Cu(II)</u>	<u>Absorbancia*</u>
0	0,005
1	0,106
2	0,205
3	0,306
4	0,398
5	0,486

$A = 9,429 \cdot 10^{-3} + 9,663 \cdot 10^{-2} \text{ ppm}$
 $r = 0,9996$

B) Recta de calibrado : dilución 1/125

<u>ppm Cu(II)</u>	<u>Absorbancia*</u>
0	0,005
1	0,105
2	0,202
3	0,298
4	0,391
5	0,478

$A = 9,429 \cdot 10^{-3} + 9,483 \cdot 10^{-2} \text{ ppm}$
 $r = 0,9997$

C) Recta de calibrado : dilución 1/250

<u>ppm Cu(II)</u>	<u>Absorbancia*</u>
0	0,009
1	0,117
2	0,219
3	0,320
4	0,417
5	0,514

$A = 1,424 \cdot 10^{-2} + 1,006 \cdot 10^{-1} \text{ ppm}$
 $r = 0,9998$

*La absorbancia es el valor medio de diez lecturas, realizadas 5 antes de pasar la muestra y cinco después.

Tabla 10.- Curvas de calibrado para la determinación de Cu en el sistema Cu(II)-2-sulfoetilbiguanida-EDTA.

tiempo (hr)	dilución	Absorbancia*	ppm Cu determinadas	concentración de Cu inicial
1	1/25	0,115	1,09	$4,299 \cdot 10^{-4}$
2	1/25	0,220	2,18	$8,574 \cdot 10^{-4}$
3	1/25	0,306	3,07	$1,208 \cdot 10^{-3}$
5	1/125	0,106	1,02	$2,003 \cdot 10^{-3}$
7	1/125	0,152	1,50	$2,958 \cdot 10^{-3}$
8	1/125	0,168	1,67	$3,290 \cdot 10^{-3}$
18	1/125	0,387	3,98	$7,833 \cdot 10^{-3}$
24	1/125	0,426	4,39	$8,642 \cdot 10^{-3}$
42	1/250	0,280	2,64	$1,040 \cdot 10^{-2}$
43	1/250	0,279	2,63	$1,036 \cdot 10^{-2}$
48	1/250	0,279	2,63	$1,036 \cdot 10^{-2}$

* Media de 5 lecturas

Tabla 11.- Determinación de Cu en el sistema
Cu(II)-2-sulfoetilbiguanida-EDTA.

II.2.3.- VALORACIONES CONDUCTIMÉTRICAS DE BIGUANIDAS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

II.2.3.1.- ENSAYOS PREVIOS

Cuando a una disolución de clorhexidina ó proguanil se la añade Cu(II) , en medio amoniacal ó alcalino tiene lugar la aparición de un precipitado rosa de aspecto coposo. En el caso de la clorhexidina el pH de precipitación no puede ser superior a 11,00, puesto que se forma un sólido blanco que corresponde a dicha biguanida en su forma de base libre. Los valores de la estequiometría de estos complejos son 1:1 y 1:2 (Cu:biguanida), respectivamente. En estas mismas condiciones la metformina y moroxidina forman complejos solubles también de color rosa, cuya estequiometría es 1:2. Ambos tipos de complejos se disocian en medio ácido (1).

Se pretende utilizar dichas reacciones como medio de determinación volumétrica de biguanidas, siguiendo la reacción por medidas conductimétricas. Con este objeto se realizan una serie de valoraciones previas de las citadas biguanidas, utilizando tres disoluciones cúpricas como agentes valorantes: nitrato, acetato y sulfato.

No se observa cambio de pendiente cuando se utiliza nitrato, debido quizá a la forma de preparación de éste, que se ha obtenido disolviendo Cu(O) con HNO_3 (c) y eliminando el exceso de ácido por ebullición de la solución durante 15 mn. Si se observan cambios de pendiente para el caso del sulfato y acetato.

Método general

Se realizan una serie de mediciones conductimétricas sobre la reacción de Cu(II) y las biguanidas: clorhexidina, proguanil, metformina y moroxidina, con el fin de establecer y proponer un método sencillo de valoración de éstas.

Para ello se preparan distintas disoluciones de las biguanidas que se valoran con disolución patrón de Cu(II), en diferentes condiciones ambientales. Se hacen variar factores tales como: pH, presencia de NH_3 , presencia de etanol, anión del Cu(II) y concentración, en orden a fijar la optimización de las mencionadas reacciones.

Las disoluciones de las respectivas biguanidas se prepararon a partir del sólido cristalino secado sobre silicagel a temperatura ambiente, y por pesada de la cantidad necesaria, que posteriormente, se disuelve en agua destilada (en caliente para el caso de la clorhexidina). Una vez aforado convenientemente se pipetea alicuotas y se procede a realizar la valoración. Las biguanidas se determinan generalmente con HClO_4 en medio acético glacial potenciométricamente, utilizando electrodo de vidrio y calomelanos en metanol saturado en KCl (182).

Las disoluciones valorantes de Cu(II) se preparan a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y CuAc_2 ; y se valoran posteriormente con AEDT en medio amoniacal a pH 8,00, utilizando como indicador murexida.

Los valores de conductividad se obtienen con un conductímetro Crison 522, digital, cuya gama de escalas va desde 20 μs (resolución 0,01 μs) hasta 200 ms, provisto de una célula conductimétrica Metrohm, modelo EA-608.

Simultáneamente con las mediciones conductimétricas, en la mayoría de experiencias se obtienen medidas potenciométricas del pH, en orden a facilitar la discusión de los resultados conseguidos.

La evaluación de estos resultados se basa, por un lado en la conocida estequiometría de la reacción implicada y, por otro, además del método gráfico de representación de conductividades frente

a los volúmenes de reactivo, se utiliza el método matemático de LITEANU Y CORMOS (183), basado en trazar la curva óptima, la más probable, con los puntos experimentales obtenidos. Por ello y utilizando el método de mínimos cuadrados se calculan los coeficientes (pendiente y ordenada en el origen) de las dos rectas. De esta forma, el punto de equivalencia determinado representa el valor más probable, refleja las condiciones de trabajo y puede ser considerado como una media aritmética.

En ambos casos, método gráfico y matemático, los valores computados no son los leídos directamente en el conductímetro, sino los obtenidos al realizar la corrección por dilución, multiplicando cada medida de conductividad por la relación volumen total a volumen inicial.

Resumiendo, los objetivos de este apartado consisten en poner a punto un método sencillo de valoración de biguanidas en medicamentos que se encuentran en el mercado farmacéutico español.

El esquema de trabajo seguido y que se expone a continuación consta de los siguientes puntos:

- Influencia del pH, presencia de NH_3
 - a) Utilizando CuSO_4 como valorante
 - b) Utilizando CuAc_2 como valorante
- Influencia de la concentración de etanol en el caso de la clorhexidina y proguanil
 - a) Utilizando CuSO_4 como valorante
 - b) Utilizando CuAc_2 como valorante
- Influencias de las concentraciones de reactivos
- Estudio de la exactitud y reproducibilidad del método
- Estudio de interferencias
- Aplicaciones a preparados farmacéuticos.

El estudio de los distintos parámetros experimentales se divide en dos grupos; cuando la reacción Cu(II)-biguanida lleva a la formación de productos insolubles (clorhexidina y proguanil) y cuando el complejo formado es soluble (moroxidina y metformina).

II.2.3.2.- INFLUENCIA DEL MEDIO

Método

Las valoraciones conductimétricas se llevan a cabo del modo habitual, en habitación termostataada a 25±1°C. Las lecturas de conductividad se realizan 2 mn después de adicionado el correspondiente volumen de disolución cúprica. El volumen inicial es de 60 ml, el amoníaco utilizado 0,2 M y el hidróxido sódico 0,01 M. No se estudian valores superiores de temperaturas en la valoración, puesto que la mayoría de los medios ensayados contienen amoníaco.

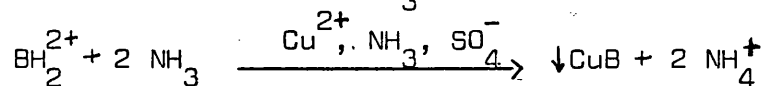
Resultados

a) COMPLEJOS SOLIDOS

Variación de pH y presencia de NH₃

Las tablas 12 y 13 y las figuras 7 y 8 muestran la influencia del pH y presencia de amoníaco en la valoración del digluconato y clorhidrato de clorhexidina, cuando el valorante utilizado es CuSO₄ en medio amoniacal.

La reacción que tendrá lugar antes del punto de equivalencia cuando en el medio existe NH₃ será:



A medida que avanza la reacción, la concentración de ión amonio va en aumento, debido a que la biguanida libera protones que consumen NH₃ del medio de la valoración. Esto explica la disminución del pH que se observa en los puntos correspondientes al pri-

mer tramo de las valoraciones realizadas. Como resultado se obtienen rectas con pendiente positiva.

Pasado el punto de equivalencia el pH aumenta ligeramente, debido a que no hay liberación de hidrogeniones al haber finalizado la reacción con Cu(II). Las variaciones de pH que se observan en las valoraciones no son bruscas, ya que el medio está tamponado por las especies $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Después del punto final el aumento de conductividad se deba a la adición de la especie $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$, dando una recta de menor pendiente en este segundo tramo.

Al aumentar la concentración de amoníaco en el medio de valoración se observa una disminución de ambas pendientes (primer y segundo tramo de la valoración), y esto se deberá a la mayor concentración de electrolito de fondo, por lo que los cambios en la concentración de ión amonio se notaran menos.

Si en vez de añadir amoníaco en el medio de la valoración se añade NaOH (curvas IV y V de las figuras 7 y 8), los resultados obtenidos son similares, ya que los valores y variación de pH son muy parecidos y el NH_3 está presente en la disolución valorante.

También hay que señalar que el comportamiento es similar para el caso del digluconato y clorhidrato; si cabe decir, que los cambios de pendiente son algo mayores para el caso del primero, hecho que puede ser explicado teniendo en cuenta que los iones gluconato, de menor densidad de carga que los iones cloruro proporcionan una menor conductividad de fondo.

v (ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NH ₃		curva IV medio NaOH		curva V medio NaOH	
	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)
0,00	6,19	89	10,61	230	11,08	252	9,07	80	9,68	106
0,40	10,00	135	10,55	249	11,06	270	10,26	122	9,92	141
0,80	10,16	164	10,50	262	11,03	290	10,50	150	10,14	173
1,20	10,21	191	10,47	288	10,98	309	10,54	176	10,22	202
1,60	10,24	217	10,44	314	10,92	331	10,58	200	10,26	232
2,00	10,24	242	10,43	343	10,82	353	10,60	225	10,24	259
2,40	10,24	267	10,41	370	10,85	376	10,61	251	10,31	287
2,80	10,24	294	10,40	400	10,83	395	10,62	277	10,32	318
3,20	10,24	318	10,39	425	10,81	413	10,65	302	10,32	348
3,60	10,24	345	10,39	446	10,80	428	10,61	330	10,33	379
4,00	10,23	372	10,40	466	10,78	445	10,63	358	10,35	407
4,40	10,23	399	10,40	484	10,77	460	10,65	378	10,38	429
4,80	10,23	424	10,41	504	10,77	476	10,66	398	10,40	450
5,20	10,24	444	10,41	523	10,76	492	10,69	418	10,42	470
5,60	10,25	463	10,42	542	10,75	509	10,70	437	10,44	490
6,00	10,26	482	10,42	562	10,75	525	10,70	457	10,46	512
6,40	10,27	500	10,43	582	10,74	545	10,70	477	10,47	532
6,80	10,28	520	10,41	602	10,73	562	10,70	498	10,48	553
7,20	10,29	539	10,42	621	10,72	580	10,73	521	10,49	573
7,60	10,30	560								
8,00	10,31	580								
8,40	10,32	599								

Valorante CuSO₄ en medio amoniacal (1:10) 1,00 10⁻² M
 Digluconato de clorhexidina 5,880 10⁻⁴ M, excepto I 7,350 10⁻⁴ M.

Tabla 12.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con Cu.

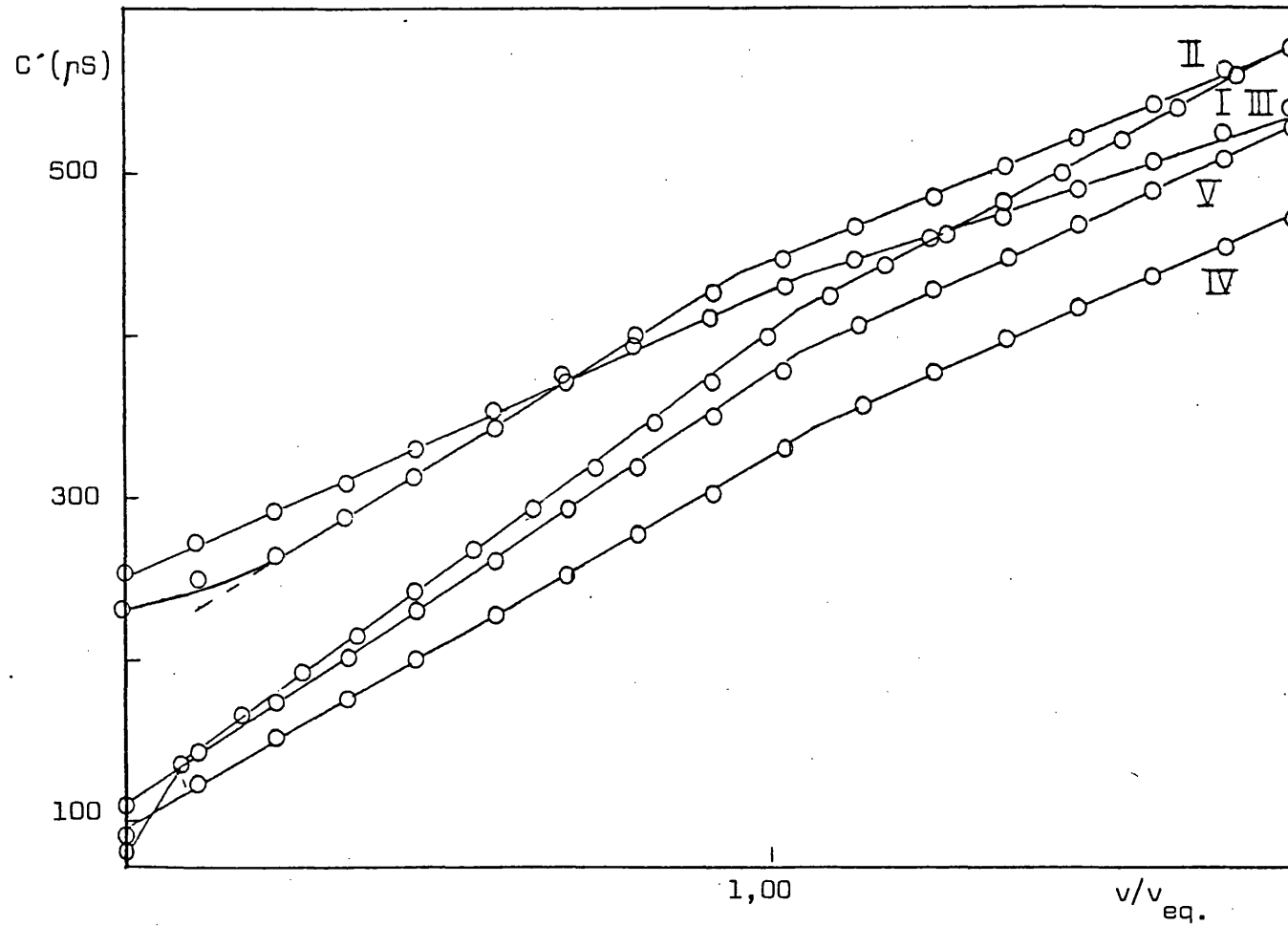


Figura 7.- Influencia del medio en las valoraciones de clorhexidina con Cu(II). (ver tabla.12)

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NH ₃		curva IV medio NaOH		curva V medio NaOH	
	pH	C'(nS)	pH	C'(nS)	pH	C'(nS)	pH	C'(nS)	pH	C'(nS)
0,00	6,10	102	10,70	259	10,75	293	10,44	180	10,77	230
0,20	8,93	154	10,69	268	10,69	302	10,41	184	10,61	227
0,40	9,40	174	10,67	281	10,68	312	10,38	193	10,66	227
0,60	9,68	192	10,65	292	10,65	324	10,34	202	10,59	230
0,80	9,83	209	10,62	306	10,65	335	10,31	213	10,53	236
1,00	9,92	224	10,59	318	10,61	348	10,30	224	10,49	244
1,20	9,98	240	10,56	331	10,59	359	10,27	237	10,46	253
1,40	10,03	254	10,54	344	10,54	373	10,26	250	10,43	264
1,60	10,07	270	10,51	358	10,53	386	10,26	262	10,40	275
1,80	10,09	285	10,50	371	10,53	400	10,26	276	10,38	287
2,00	10,11	299	10,48	386	10,50	414	10,25	289	10,37	300
2,20	10,10	314	10,46	400	10,48	423	10,26	304	10,36	312
2,40	10,11	330	10,46	410	10,50	432	10,26	313	10,37	321
2,60	10,12	343	10,44	419	10,48	440	10,28	322	10,40	330
2,80	10,13	353	10,45	428	10,44	449	10,31	332	10,40	339
3,00	10,16	363	10,48	437	10,46	458	10,31	341	10,41	349
3,20	10,16	373	10,51	447	10,46	467	10,32	351	10,43	358
3,40	10,21	382	10,55	456	10,53	477	10,34	361	10,43	367
3,60	10,24	393	10,57	465	10,56	487	10,35	371	10,44	377
3,80	10,27	404	10,60	475	10,55	495	10,36	381	10,45	387
4,00	10,31	414	10,61	484	10,58	504	10,36	391	10,45	397
4,20	10,34	424	10,63	493	10,60	515	10,37	401	10,46	407
4,40	10,37	434	10,64	506	10,61	524	10,39	411	10,47	417
4,60	10,39	444	10,65	515	10,62	534	10,39	422	10,47	427
4,80	10,40	455	10,66	526	10,62	544	10,39	432	10,47	436

Valorante CuSO₄ en medio amoniacal (1:10) 1,00 10⁻² M
 Clorhidrato de clorhexidina 4,268 10⁻⁴ M.

Tabla 13.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clor. de clorhexidina con CuSO₄.

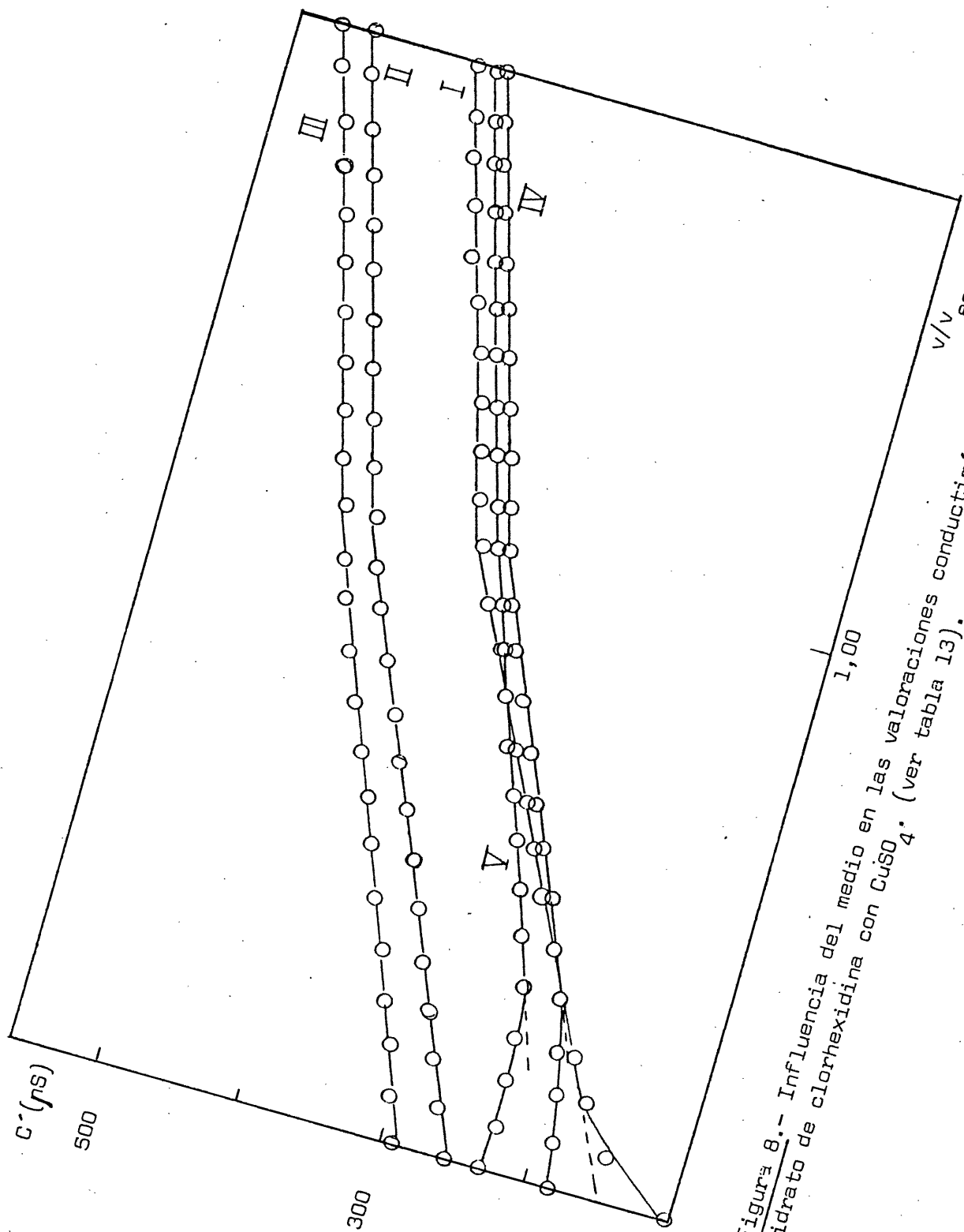
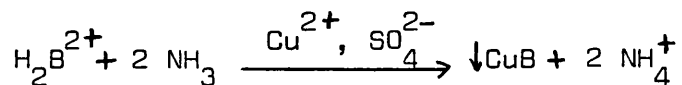


Figura 8.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con CuSO_4 . (ver tabla 13).

Las figuras 9 , 10 y 11 y las tablas 14 , 15 y 16 muestran la influencia de la concentración de NH_3 ó NaOH en la curva de valoración cuando el valorante utilizado es CuSO_4 , tanto para el digluconato como para el clorhidrato de clorhexidina.

Si el medio lo constituye la disolución de biguanida únicamente (pH_0 6,50; curvas I de las figuras 9 y 10) se obtienen líneas rectas únicas, para ambas sales de clorhexidina, lo que indica que no existe reacción entre éste y el Cu(II) , hecho que también se pone de manifiesto visualmente puesto que no se observa la aparición de precipitado.

Si existe NH_3 en el medio, a medida que aumenta la concentración de éste la pendiente del primer tramo de la valoración va aumentando, tomando siempre valores positivos. La reacción que tiene lugar antes del punto de equivalencia es:

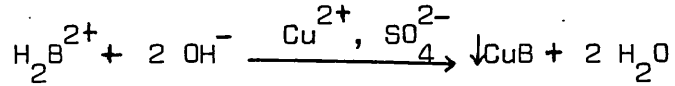


Luego a medida que aumenta el pH, la cantidad de NH_3 es mayor, con lo que dicha reacción tendrá lugar en mayor extensión.

El segundo tramo de la valoración también va aumentando su pendiente a medida que aumenta la concentración de NH_3 en el medio, debido a la especie $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ y a que el pH para los puntos correspondientes a este segundo tramo va aumentando de una valoración a otra y por consiguiente la concentración de oxidrilos en el medio.

En cuanto a lo que sucede al ajustar el medio con NaOH , hay que decir, que la forma de la gráfica varía debido a la ausencia de la especie NH_4^+ . Se observa un primer cambio de pendiente debido a un cambio brusco de pH, puesto que el medio no está tamponado, y un segundo cambio debido a la reacción que nos ocupa. Las pendientes del primer tramo de la valoración son positivas, pró-

ximas a cero cuando el pH inicial es de 10,00 aproximadamente, y negativas para pH superiores; la reacción que tendrá lugar antes del punto de equivalencia sera:



El segundo tramo de la valoración presenta siempre valores de pendiente positivos debido a la adición de valorante, obteniéndose para valores de pH próximos a 10,00 gráficas en forma de V. Para el caso del clorhidrato el valor de la pendiente es superior al correspondiente al digluconato, debido a la conductividad de fondo proporcionada por el ión cloruro.

En las figuras 12 - y 13 , y en las tablas 17 y 18 se representan las curvas obtenidas en la valoración de proguanil con Cu(II), obtenidas al variar el pH del medio y la cantidad de NH₃ presente.

La discusión de los resultados obtenidos es similar a la realizada para la clorhexidina, sin embargo, para el proguanil el rango de pH estudiado es más amplio, ya que no existe la limitación impuesta por la aparición de la base libre como ocurría con la clorhexidina. Se observa que a medida que aumenta la concentración de oxidrilos en el medio, van disminuyendo las pendientes correspondientes al primer y segundo tramo de la valoración, de manera que para pH entre 11,00-11,40 se obtienen gráficas en forma de L. Para pH superiores el ángulo entre las rectas va aumentando, debido a la mayor concentración de oxidrilos en el medio, lo que se traduce en una conductividad de fondo más alta.

En la tabla 19 y la figura 14 se presentan valoraciones de clorhidrato de clorhexidina con acetato de Cu(II). Al aumentar la concentración de NaOH en el medio, las pendientes de ambos tramos disminuyen. Los efectos en el primer tramo son mucho más acusados

y esto es explicable teniendo presente que, al aumentar la concentración de oxidrilos en el medio va predominando la reacción de eliminación de éstos del medio, debido a los hidrogeniones donados por la biguanida con la consiguiente formación de agua. Este efecto es más notorio cuando se utiliza acetato, ya que este ión de mayor tamaño y menor carga que el sulfato aporta menor conductividad de fondo. Este hecho también justificaría la pequeña disminución de la pendiente del segundo tramo de la valoración al aumentar la concentración de NaOH, si además se tiene en cuenta que la concentración del valorante acetato de Cu(II) utilizado para la realización de las valoraciones de la figura 14, es inferior a la del sulfato de Cu(II) utilizado en las valoraciones que se presentan en las figuras 7, 8, 9, 10 y 11.

Influencia de la concentración de etanol

En la figura 15 y en la tabla 20 se muestran la influencia de la concentración de etanol en las curvas de valoración de clorhexidina y proguanil utilizando como valorante acetato de cobre (II).

La presencia de etanol mejora la definición de la curva en las cercanías del punto final, al aumentar la cantidad de la reacción. Sin embargo, aumenta el ángulo entre las rectas correspondientes al primer y segundo tramo de la valoración, retrasando a la vez el inicio de la reacción de precipitación, apartando los primeros puntos de la recta que corresponde al primer tramo de la valoración.

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NH ₃		curva IV medio NH ₃ /NaOH 8:1	
	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)
0,00	6,43	60	9,91	114	10,45	164	10,80	212
0,20	6,00	66	9,89	121	10,40	172	10,77	215
0,40	5,55	73	9,82	128	10,35	178	10,75	219
0,60	5,40	80	9,75	135	10,32	186	10,70	224
0,80	5,27	87	9,68	142	10,28	193	10,66	228
1,00	5,19	94	9,60	150	10,24	201	10,62	233
1,20	5,12	100	9,53	157	10,21	209	10,57	238
1,40	5,07	108	9,40	165	10,18	217	10,55	244
1,60	5,02	115	9,12	172	10,15	225	10,50	250
1,80	4,99	121	8,78	179	10,11	233	10,45	256
2,00	4,95	129	8,61	187	10,09	241	10,42	262
2,20	4,92	136	8,42	193	10,05	250	10,38	269
2,40	4,89	143	8,25	200	10,02	258	10,34	277
2,60	4,86	149	7,91	206	10,00	266	10,30	285
2,80	4,83	156	7,64	212	9,97	275	10,26	294
3,00	4,82	163	7,45	217	9,93	284	10,22	303
3,20	4,79	170	7,30	219	9,91	293	10,18	313
3,40	4,77	176	7,06	221	9,87	301	10,15	324
3,60	4,74	182	6,95	223	9,85	310	10,11	335
3,80	4,71	188	6,86	225	9,82	320	10,07	344
4,00	4,68	194	6,74	226	9,80	329	10,05	352
4,20	4,65	201	6,68	228	9,76	339	10,03	361
4,40	4,63	207	6,64	231	9,72	350	10,00	370
4,60	4,60	213	6,60	233	9,70	361	9,98	379
4,80	4,58	219	6,55	235	9,67	370	9,95	389
5,00	4,56	226	6,50	237	9,65	379	9,90	397

Valorante CuSO₄ 9,875 10⁻³ M
 Digluconato de clorhexidina 4,41 10⁻⁴ M.

Tabla 14.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de Digluconato de clorhexidina con CuSO₄.

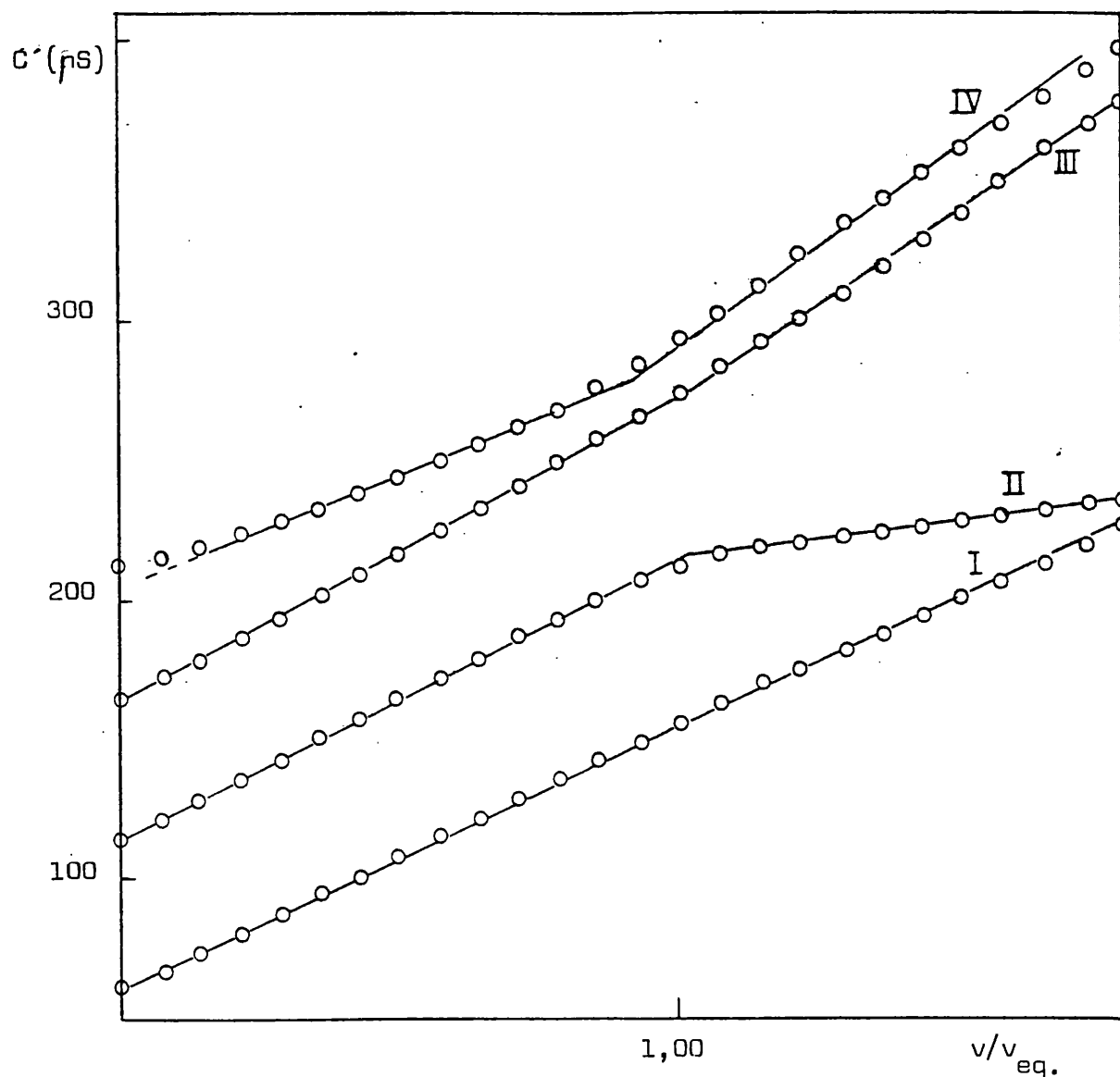


Figura 9.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de Digluconato de Clorhexidina con CuSO_4 (ver tabla 14).

v(ml)	curva I medio agua		curva II medio NH ₃		curva III medio NH ₃		curva IV medio NH ₃	
	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)
0,00	6,46	103	10,00	148	10,55	190	10,65	217
0,20	6,05	110	9,96	154	10,50	196	10,60	222
0,40	5,60	119	9,90	160	10,46	203	10,54	230
0,60	5,36	128	9,80	167	10,39	210	10,49	238
0,80	5,20	136	9,71	175	10,33	217	10,44	246
1,00	5,11	145	9,63	182	10,27	226	10,40	255
1,20	5,04	153	9,54	189	10,22	236	10,36	264
1,40	4,99	161	9,45	197	10,27	246	10,33	273
1,60	4,94	168	9,36	204	10,13	256	10,29	284
1,80	4,90	177	9,24	211	10,07	267	10,24	294
2,00	4,87	185	9,15	219	10,04	279	10,20	306
2,20	4,84	192	9,02	227	10,00	291	10,17	318
2,40	4,80	200	8,91	234	9,97	299	10,14	326
2,60	4,76	207	8,76	241	9,95	307	10,13	332
2,80	4,72	215	8,61	248	9,93	315	10,11	340
3,00	4,69	223	8,50	255	9,90	323	10,08	348
3,20	4,65	230	8,35	262	9,88	332	10,06	355
3,40	4,62	237	8,21	267	9,86	342	10,05	363
3,60	4,59	244	8,08	272	9,84	350	10,03	372
3,80	4,56	252	7,95	279	9,82	359	10,02	381
4,00	4,53	259	7,85	284	9,80	368	10,00	389
4,20	4,51	267	7,77	291	9,78	377	9,99	398
4,40	4,49	274	7,70	296	9,76	386	9,97	407
4,60	4,47	281	7,64	303	9,75	395	9,96	416
4,80	4,45	288	7,60	307	9,73	404	9,94	425
5,00	4,43	295	7,56	314	9,71	414	9,93	433

Valorante CuSO₄ 9,875 10⁻³ M
 Clorhidrato de clórhexidina 4,124 10⁻⁴ M.

Tabla 15.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clórhexidina con CuSO₄.

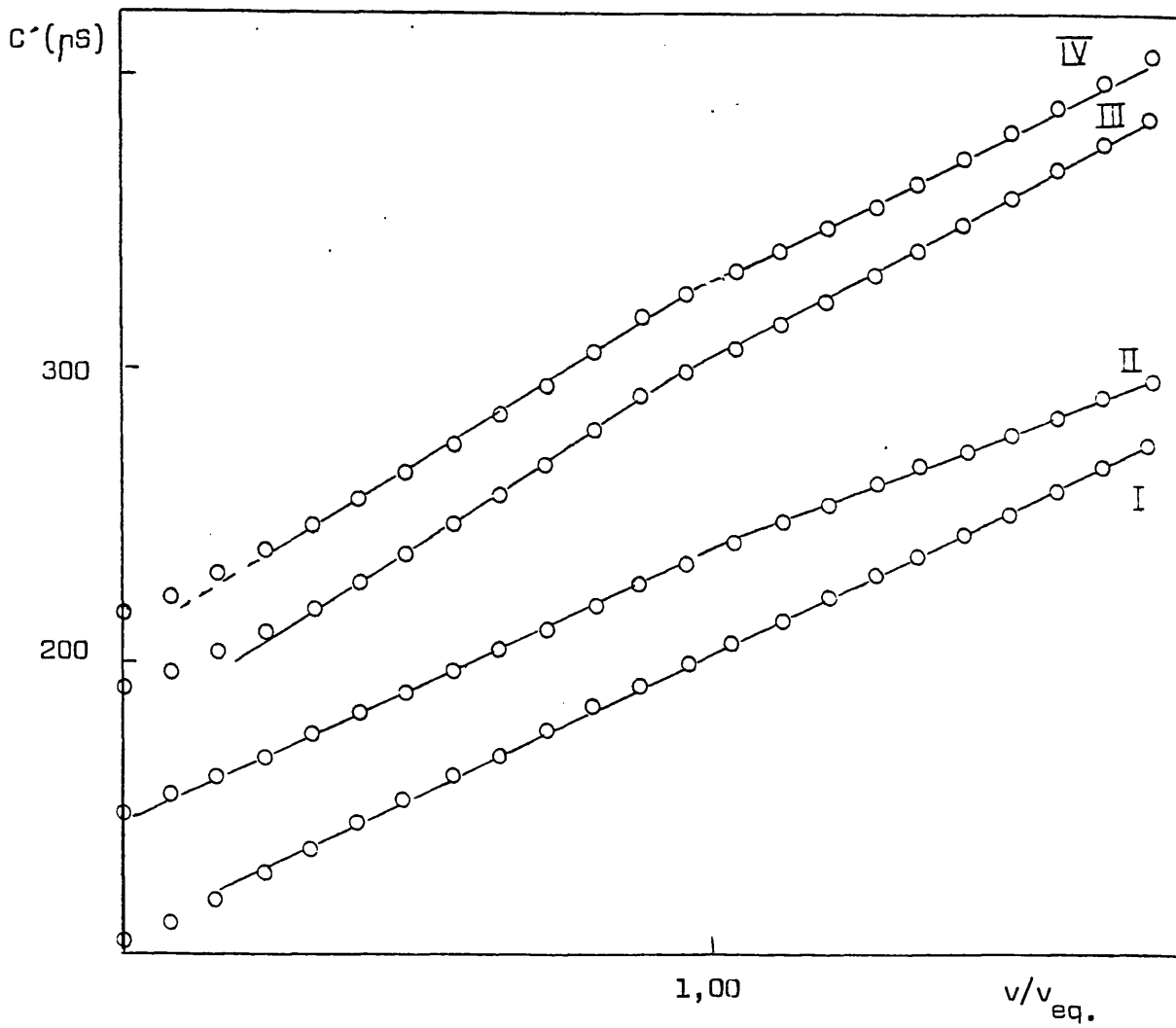


Figura 10.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con $CuSO_4$ (ver tabla 15).

v(ml)	curva I		curva II		curva III		curva IV		curva V	
	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)
0,00	10,10	120	10,30	187	10,50	223	10,00	168	10,25	232
0,20	9,92	113	10,25	179	10,49	217	9,70	161	10,10	225
0,40	9,52	106	10,15	171	10,41	211	9,02	155	9,90	216
0,60	8,80	101	10,03	163	10,30	204	8,12	154	9,70	208
0,80	8,06	100	9,81	155	10,16	197	7,70	152	9,40	200
1,00	7,70	99	9,58	148	10,02	191	7,52	151	8,93	194
1,20	7,50	97	9,15	140	9,80	182	7,39	150	8,39	189
1,40	7,35	98	8,57	136	9,52	177	7,25	148	8,01	186
1,60	7,24	99	8,18	134	9,11	170	7,15	149	7,90	182
1,80	7,13	101	7,90	132	8,65	166	7,04	150	7,73	178
2,00	7,02	104	7,66	129	8,31	162	7,00	153	7,60	176
2,20	6,92	109	7,37	127	8,05	159	6,94	159	7,46	173
2,40	6,85	112	7,19	129	7,80	157	6,86	163	7,30	172
2,60	6,77	118	7,03	129	7,65	156	6,84	170	7,21	177
2,80	6,68	123	6,90	132	7,52	155	6,77	176	7,15	183
3,00	6,62	128	6,78	135	7,44	157	6,72	183	7,09	190
3,20	6,54	134	6,67	138	7,33	159	6,68	189	7,06	196
3,40	6,51	140	6,58	143	7,25	161	6,62	197	7,03	203
3,60	6,41	146	6,51	148	7,16	164	6,58	204	7,00	210
3,80	6,36	152	6,44	153	7,10	168	6,54	211	6,98	217
4,00	6,31	159	6,36	158	7,03	171	6,49	218	6,97	225
4,20	6,20	164	6,30	164	6,96	176	6,46	224	6,95	231
4,40	6,15	170	6,25	169	6,90	180	6,42	232	6,90	239
4,60	6,09	177	6,20	175	6,83	184	6,34	239	6,90	246
4,80	6,03	183	6,15	181	6,77	189	6,33	247	6,90	253
5,00	6,02	189	6,10	186	6,72	193	6,29	253	6,88	261

Valorante CuSO_4 $9,875 \cdot 10^{-3}$ M; I,II, III Diguconato de Clorhexidina $4,410 \cdot 10^{-4}$ M

IV y V Clorhidrato de clorhexidina $4,426 \cdot 10^{-4}$ M. Medio : NaOH.

Tabla 16.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de Clorhexidina con CuSO_4 .

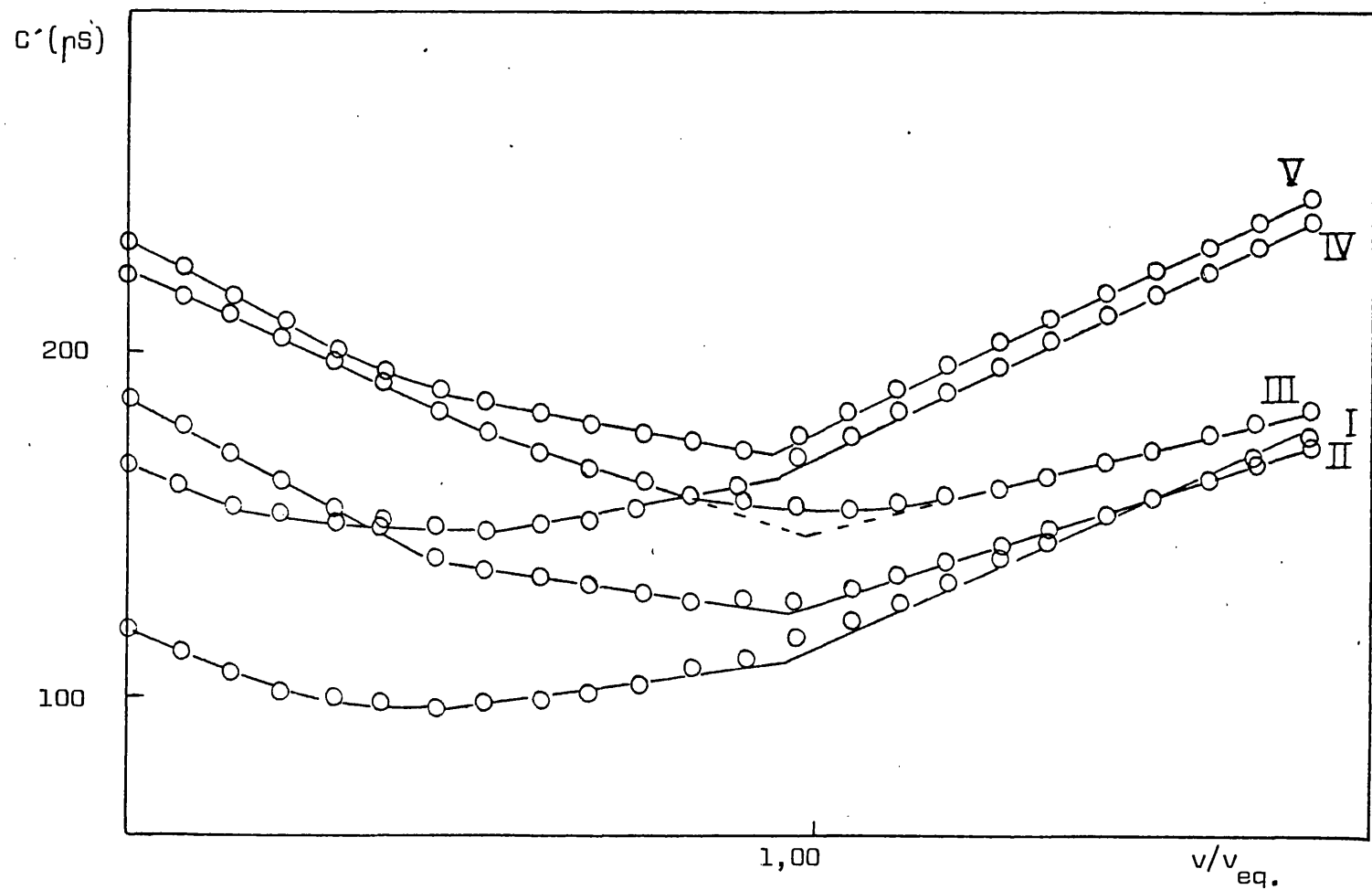


Figura 11.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con CuSO_4 (ver tabla 16).

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NH ₃		curva IV medio NaOH		curva V medio NaOH	
	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)
0,00	6,70	106	10,48	242	10,65	318	10,75	551	11,30	962
0,20	8,93	135	10,45	252	10,63	327	10,81	535	11,30	947
0,40	9,16	152	10,43	263	10,61	337	10,90	521	11,35	931
0,60	9,26	168	10,40	276	10,59	347	10,91	506	11,37	917
0,80	9,33	186	10,37	289	10,56	358	10,92	492	11,37	902
1,00	9,37	201	10,35	302	10,53	368	10,91	478	11,36	887
1,20	9,38	217	10,32	315	10,51	380	10,88	465	11,35	872
1,40	9,41	233	10,29	330	10,49	393	10,85	453	11,34	858
1,60	9,42	249	10,28	344	10,47	405	10,79	444	11,32	843
1,80	9,42	263	10,25	358	10,46	418	10,73	436	11,30	828
2,00	9,44	280	10,24	374	10,43	431	10,68	431	11,28	812
2,20	9,44	294	10,22	388	10,41	444	10,61	428	11,25	799
2,40	9,44	310	10,21	405	10,40	457	10,55	430	11,22	783
2,60	9,45	325	10,20	420	10,39	469	10,48	434	11,18	768
2,80	9,47	338	10,19	430	10,38	478	10,46	441	11,15	760
3,00	9,49	349	10,20	439	10,38	488	10,45	449	11,13	754
3,20	9,52	360	10,19	449	10,38	496	10,44	458	11,12	748
3,40	9,54	371	10,20	459	10,38	505	10,43	467	11,09	743
3,60	9,57	383	10,20	469	10,39	515	10,43	477	11,06	739
3,80	9,59	394	10,19	480	10,38	525	10,43	487	11,04	736
4,00	9,60	406	10,20	490	10,38	535	10,42	498	11,02	733
4,20	9,62	418	10,23	500	10,39	545	10,40	510	11,00	732
4,40	9,64	430	10,22	511	10,38	555	10,39	521	11,00	731
4,60	9,66	442	10,23	522	10,39	565	10,37	532	10,97	731
4,80	9,67	454	10,22	533	10,39	575	10,37	543	10,95	732

Valorante CuSO₄ 1,00 10⁻² M en medio amoniacal (1:10). Concentración de Proguanil 8,284 10⁻⁴ M.

Tabla 17.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con CuSO₄ en medio amoniacal.

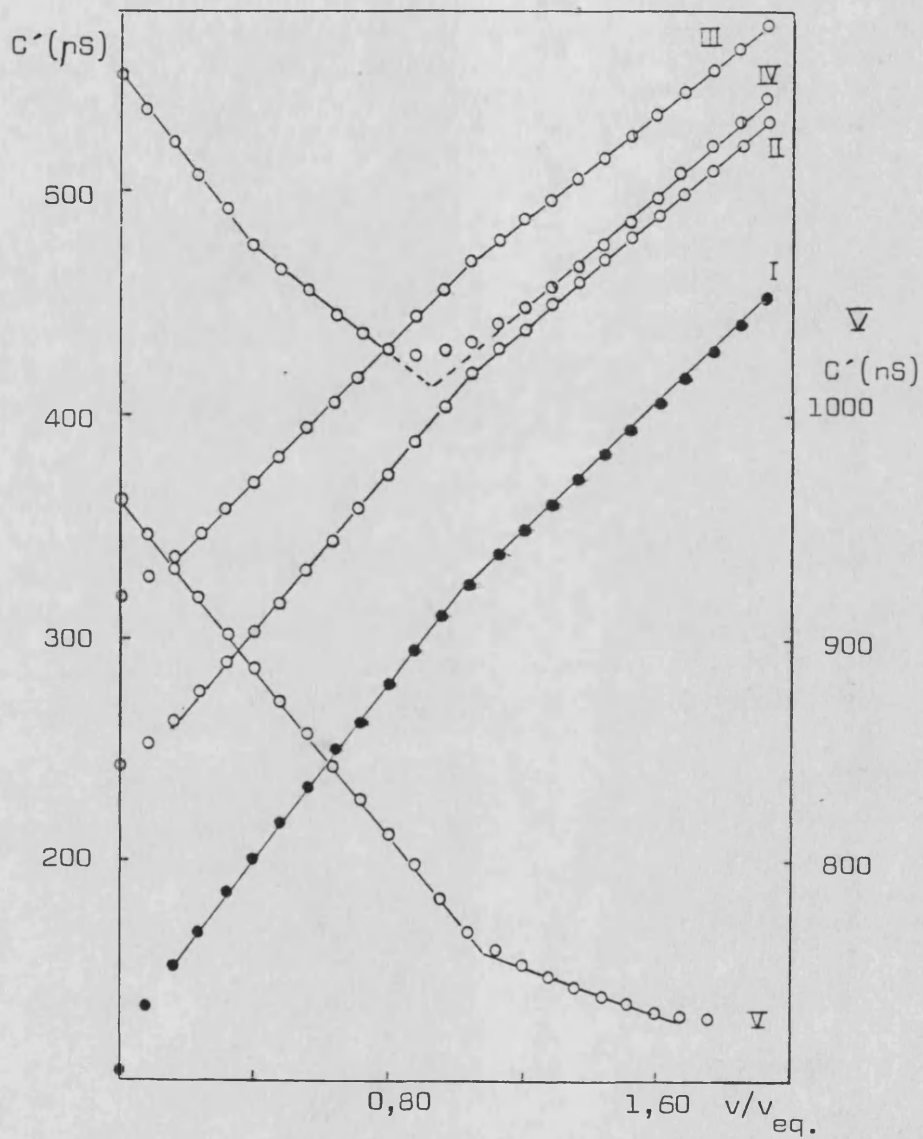


Figura 12.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con $CuSO_4$ en medio amoniacal (ver tabla 17).

v(ml)	curva I medio NH ₃		curva II medio NH ₃		curva III medio NaOH-NH ₃ 1:7		curva IV medio NaOH	
	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)
0,00	10,01	163	10,40	282	11,40	859	11,64	1267
0,20	9,92	171	10,33	291	11,40	842	11,63	1249
0,40	9,80	181	10,30	300	11,38	827	11,63	1233
0,60	9,71	193	10,26	311	11,36	811	11,60	1209
0,80	9,60	205	10,23	321	11,33	795	11,59	1193
1,00	9,51	218	10,19	333	11,31	778	11,58	1174
1,20	9,45	231	10,16	345	11,28	763	11,56	1157
1,40	9,37	245	10,12	358	11,27	747	11,55	1141
1,60	9,29	257	10,08	370	11,23	731	11,53	1125
1,80	9,22	268	10,05	382	11,21	716	11,52	1109
2,00	9,16	279	10,03	394	11,18	700	11,50	1092
2,20	9,11	288	10,01	402	11,15	689	11,48	1076
2,40	9,06	299	10,00	409	11,12	681	11,46	1066
2,60	9,01	308	9,98	416	11,11	674	11,45	1054
2,80	9,00	318	9,96	422	11,08	667	11,44	1043
3,00	8,93	328	9,96	429	11,07	660	11,42	1032
3,20	8,89	337	9,95	437	11,04	654	11,41	1021
3,40	8,83	347	9,94	445	11,00	649	11,39	1009
3,60	8,78	357	9,93	453	10,99	644	11,38	998
3,80	8,73	367	9,92	462	10,97	640	11,36	986
4,00	8,68	377	9,91	470	10,93	636	11,34	974
4,20	8,61	386	9,90	478	10,90	633	11,32	964
4,40	8,56	395	9,90	487	10,88	631	11,31	952
4,60	8,50	404	9,88	498	10,85	629	11,28	940
4,80	8,43	413	9,88	507	10,82	628	11,26	929
5,00	8,38	422	9,87	517	10,79	628	11,24	919

Valorante CuSO₄ 1,00 10⁻² M. Concentración de
 Proguanil 6,627 10⁻⁴ M.

Tabla 18.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con CuSO₄.

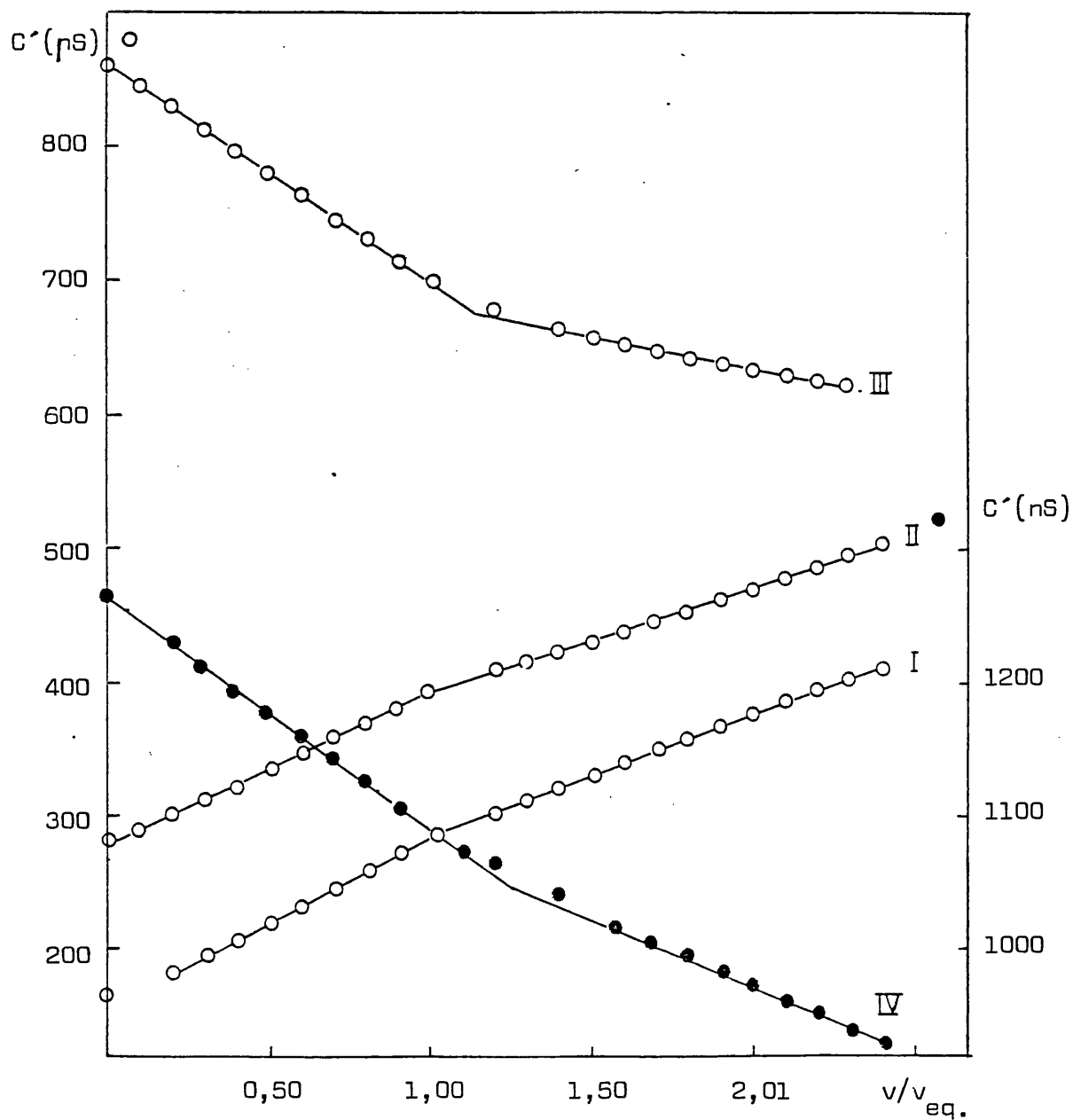


Figura 13.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de proguanil con CuSO_4 (ver tabla 18).

v(ml)	curva I medio NH ₃		curva II medio NaOH-NH ₃ 1:10		curva III medio NaOH-NH ₃ 1:7	
	pH	C' (nS)	pH	C' (nS)	pH	C' (nS)
0,00	10,41	131,6	10,52	220,0	10,71	297
0,20	10,41	131,9	10,51	218,5	10,70	293
0,40	10,40	132,4	10,51	217,0	10,69	290
0,60	10,39	132,9	10,51	215,5	10,69	287
0,80	10,39	133,3	10,50	214,0	10,68	284
1,00	10,38	133,9	10,50	212,0	10,68	281
1,20	10,38	134,3	10,49	210,0	10,67	279
1,40	10,38	135,0	10,49	208,5	10,66	276
1,60	10,37	135,5	10,48	207,0	10,65	273
1,80	10,37	136,1	10,48	206,0	10,64	271
2,00	10,36	136,9	10,47	205,0	10,64	269
2,20	10,36	137,3	10,47	204,0	10,64	267
2,40	10,35	138,2	10,46	203,5	10,63	265
2,60	10,35	139,0	10,45	203,0	10,62	264
2,80	10,34	139,6	10,45	202,5	10,61	263
3,00	10,34	140,2	10,45	202,0	10,61	262
3,20	10,33	141,4	10,44	201,0	10,60	261
3,40	10,33	141,8	10,44	201,0	10,60	260
3,60	10,31	143,0	10,43	201,0	10,59	259
3,80	10,30	143,4	10,43	201,0	10,58	258
4,00	10,29	144,3	10,42	201,0	10,57	257
4,20	10,28	145,1	10,42	201,0	10,56	256
4,40	10,28	145,8	10,41	201,0	10,55	255
4,60	10,28	146,6	10,40	201,0	10,53	254
4,80	10,26	147,4	10,40	201,0	10,52	254

Valorante Cu(Acetato)₂ 1,335 10⁻³ M

Concentracion del Clorhidrato de clorhexidina 5,869 10⁻⁵ M.

Tabla 19.- Influencia del medio en las valoraciones

conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con Cu(Ac)₂.

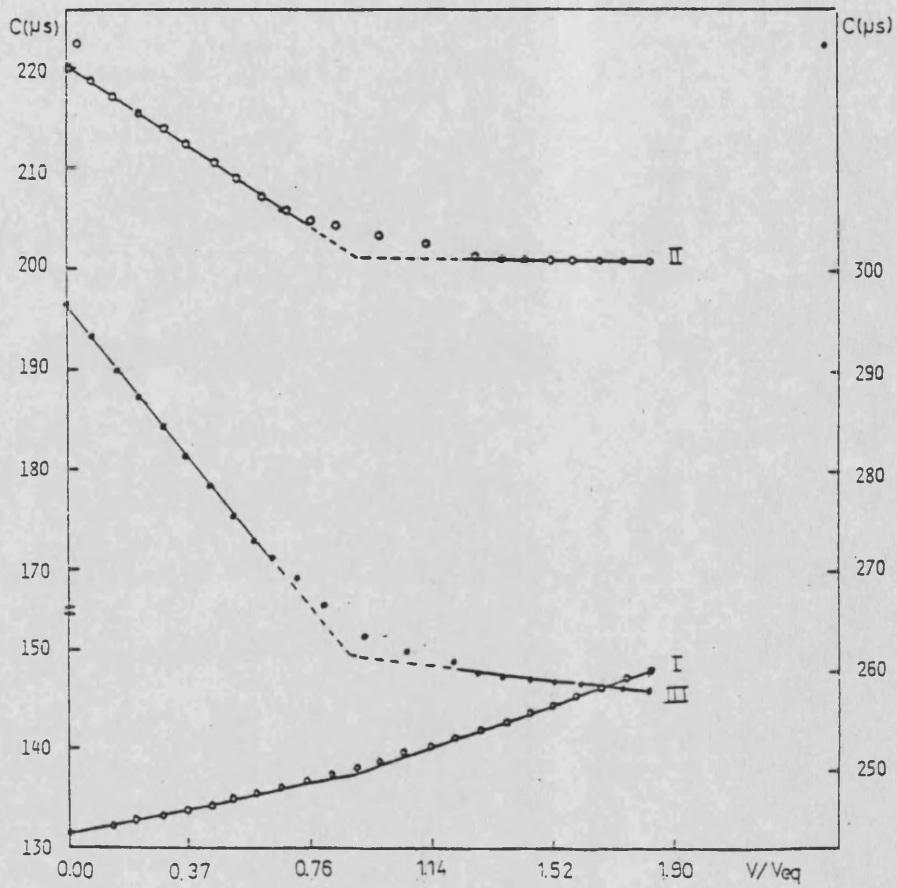


Figura 14.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de clorhexidina con $Cu(Acetato)_2$ (ver tabla 19).

medio	curva I		curva II	curva III	curva IV		curva V	curva VI
	NaOH-NH ₃ (1:10)		NaOH-NH ₃ (1:10) 15% etanol	NaOH-NH ₃ (1:10) 30% etanol	NaOH-NH ₃ (1:7)		NaOH-NH ₃ (1:7) 15% etanol	NaOH-NH ₃ (1:7) 15% etanol
v(ml)	pH	C' (µS)	C' (µS)	C' (µS)	pH	C' (µS)	C' (µS)	C' (µS)
0,00	10,52	220,0	111,1	98,2	10,71	297	230	253
0,20	10,51	218,5	109,8	97,0	10,70	293	227	248
0,40	10,51	217,0	108,6	96,0	10,69	290	225	244
0,60	10,50	215,5	107,2	94,6	10,68	287	220	234
0,80	10,50	214,0	106,5	93,7	10,68	284	219	227
1,00	10,50	212,0	105,6	92,8	10,68	281	217	224
1,20	10,49	210,0	104,8	91,8	10,67	279	214	221
1,40	10,49	208,5	104,2	91,0	10,66	276	212	218
1,60	10,48	207,0	103,5	89,9	10,65	273	210	215
1,80	10,48	206,0	103,0	88,2	10,64	271	207	212
2,00	10,47	205,0	102,5	88,9	10,64	269	205	209
2,20	10,47	204,0	102,3	88,3	10,64	267	203	207
2,40	10,46	203,5	102,2	87,6	10,63	265	201	206
2,60	10,46	203,0	102,2	87,0	10,63	264	198	205
2,80	10,45	202,5	102,3	86,3	10,62	263	197	203
3,00	10,45	202,0	102,4	85,8	10,61	262	196	202
3,20	10,44	201,0	102,5	85,2	10,60	261	195	201
3,40	10,44	201,0	102,6	84,7	10,60	260	193	-
3,60	10,43	201,0	102,5	84,2	10,59	259	192	200
3,80	10,43	201,0	102,6	83,9	10,58	258	191	-
4,00	10,42	201,0	102,8	83,4	10,57	257	190	199
4,20	10,42	201,0	103,1	82,8	10,56	256	189	-
4,40	10,41	201,0	103,3	82,4	10,55	255	188	198
4,60	10,40	201,0	103,6	82,8	10,53	254	187	-
4,80	10,40	201,0	104,3	81,2	10,52	254	186	196

Valorante Cu(Acetato)₂ 1,335 10⁻³ M excepto VI, 2,80 10⁻³ M. Concentración de clorhidrato de clorhexidina 5,869 10⁻⁵ M excepto VI, proguanil 2,28 10⁻⁴ M.

Tabla 20.- Influencia de la concentración de etanol en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina ó proguanil con Cu(Acetato)₂.

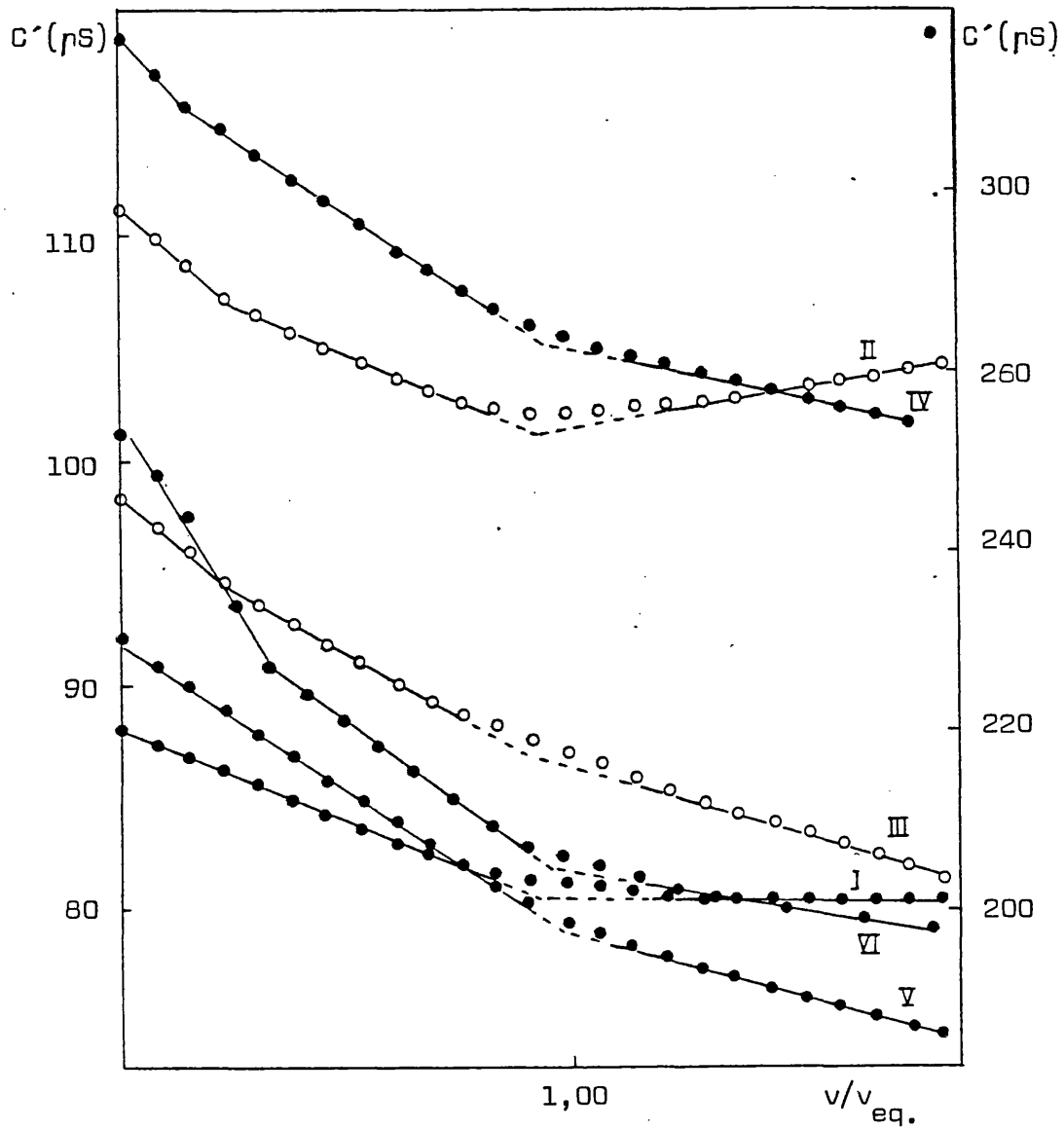


Figura 15.- Influencia de la concentración de etanol en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina y proguanil con $Cu(Acetato)_2$ (ver tabla 20).

b).- COMPLEJOS SOLUBLES

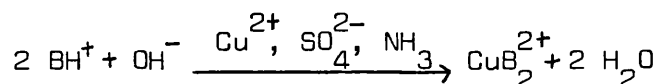
Variación del pH y presencia de amoníaco

En las tablas 21 , 22a y 22b y en las figuras 16 y 17 se presentan valoraciones de metformin y moroxidina en las que, el valorante utilizado es sulfato de cobre (II) en medio amoniacal.

Si la base utilizada para ajustar el pH del medio es el amoníaco, las pendientes del primer y segundo tramo de la valoración son muy semejantes, no siendo adecuadas para la determinación del punto final.

Si se utiliza hidróxido sódico aún cuando el amoníaco está presente pues se adiciona desde el valorante, para pHs alrededor de 11.25 se obtienen gráficas en forma de V. Si el pH es superior a 11,50 la forma de las gráficas es de L.

Las pendientes del primer tramo de la valoración son negativas debido a la siguiente reacción que tiene lugar:



La pendiente del segundo tramo pasa de valores positivos a negativos a medida que aumenta la concentración de hidróxido sódico en el medio, debido a un desplazamiento del predominio de las especies hidroxiladas de Cu(II) sobre las aminadas.

Se observa que a medida que aumenta el pH del medio la cantidad de la reacción es mayor y el angulo entre las dos rectas implicadas también aumenta.

De la observación de las mencionadas figuras se deduce que el comportamiento de la metformina y moroxidina es similar al va-

riar el pH y la presencia de amoníaco.

La discusión anterior es aplicable también, cuando el valorante utilizado es sulfato de cobre (II) en la determinación de metformina y moroxidina (tablas 23 , 24 y figuras 18 y 19).

En la tabla 25 y figura 20 se representan valoraciones de metformina utilizando $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ como valorante. El comportamiento presentado al variar el pH del medio es similar al expuesto anteriormente, sin embargo, se observa un retraso en la aparición del complejo, hecho que se pone de manifiesto ya que los puntos iniciales de la valoración se alejan de la recta que constituye el primer tramo; ésto puede ser debido a la influencia que ejercen los complejos $\text{Cu}(\text{II})$ -Acetato sobre el $\text{Cu}(\text{II})$ -biguanida, siendo este hecho más importante en este caso que en el caso de los precipitados que se obtienen con clorhexidina y proguanil, ya que los complejos sólidos son más estables que los solubles y en el caso del precipitado el $\text{Cu}(\text{II})$ pasa a formar parte de otra fase distinta.

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NaOH		curva IV medio NaOH		curva V medio NaOH	
	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)
0,00	5,70	101	10,08	173	11,38	800	11,65	1320	11,81	1804
0,20	10,06	151	10,19	196	11,36	775	11,62	1290	11,78	1776
0,40	10,22	175	10,27	216	11,34	753	11,60	1264	11,77	1748
0,60	10,30	196	10,32	234	11,32	734	11,59	1239	11,76	1720
0,80	10,35	215	10,35	251	11,29	715	11,57	1213	11,76	1695
1,00	10,39	233	10,38	267	11,26	700	11,55	1190	11,74	1668
1,20	10,42	250	10,40	284	11,24	587	11,54	1169	11,73	1642
1,40	10,44	266	10,42	298	11,22	676	11,52	1150	11,70	1612
1,60	10,45	282	10,45	314	11,19	668	11,50	1132	11,69	1578
1,80	10,48	297	10,47	329	11,17	661	11,49	1117	11,68	1556
2,00	10,49	313	10,48	343	11,15	656	11,47	1102	11,67	1538
2,20	10,50	327	10,50	358	11,12	654	11,46	1090	11,66	1523
2,40	10,52	342	10,51	372	11,11	652	11,45	1078	11,65	1508
2,60	10,53	356	10,52	386	11,09	652	11,43	1068	11,64	1493
2,80	10,54	371	10,53	400	11,07	654	11,41	1058	11,63	1482
3,00	10,55	385	10,54	413	11,06	656	11,40	1050	11,62	1470
3,20	10,56	398	10,55	428	11,04	660	11,38	1043	11,61	1459
3,40	10,57	412	10,56	441	11,03	664	11,37	1036	11,60	1448
3,60	10,58	427	10,57	455	11,02	670	11,36	1031	11,59	1439
3,80	10,59	440	10,58	468	11,01	676	11,35	1027	11,58	1430
4,00	10,60	454	10,59	482	11,00	683	11,33	1023	11,57	1422
4,20	10,61	467	10,59	495	10,98	689	11,32	1020	11,56	1415
4,40	10,61	480	10,60	508	10,98	696	11,31	1018	11,55	1407
4,60	10,61	494	10,61	522	10,97	705	11,30	1017	11,54	1401
4,80	10,61	506	10,61	535	10,98	713	11,28	1015	11,54	1395
5,00	10,62	519	10,62	548	10,95	723	11,27	1015	11,53	1390

Valorante CuSO₄ 9,88 10⁻³ M en medio amoniacal (1:10). Concentración de metformin 6,91 10⁻⁴ M.
 Tabla 21.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorh. de metformina con CuSO₄ en medio amoniacal.

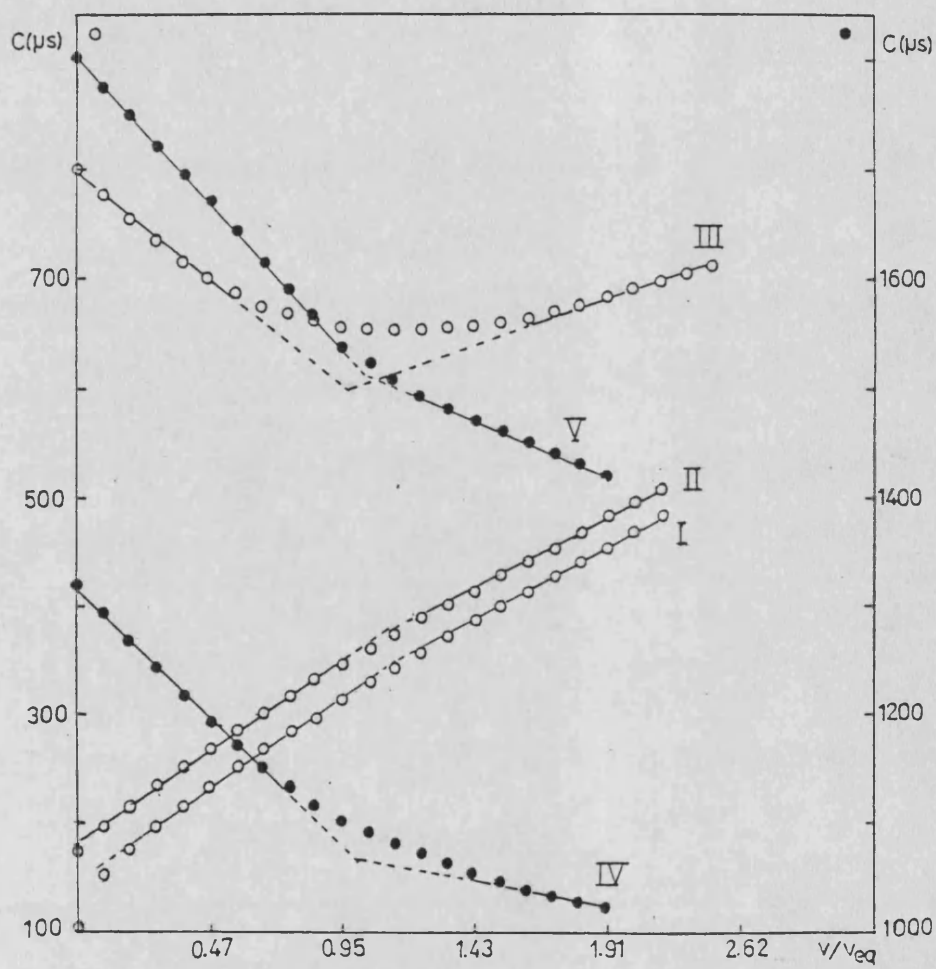


Figura 16.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformin con $CuSO_4$ en medio amoniacal (ver tabla 21).

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NH ₃		curva IV medio NaOH	
	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)
0,00	6,50	99	10,20	169	10,44	239	10,43	192
0,20	9,55	132	10,16	181	10,42	249	10,34	187
0,40	9,72	152	10,14	194	10,39	261	10,28	191
0,60	9,81	170	10,12	208	10,36	272	10,24	199
0,80	9,85	187	10,12	221	10,34	283	10,20	210
1,00	9,88	203	10,11	235	10,33	296	10,18	222
1,20	9,91	218	10,11	248	10,31	307	10,17	236
1,40	9,93	233	10,11	262	10,30	320	10,15	249
1,60	9,94	249	10,11	276	10,30	331	10,15	263
1,80	9,96	263	10,11	288	10,29	344	10,15	276
2,00	9,98	277	10,11	302	10,28	356	10,15	289
2,20	10,00	291	10,12	314	10,28	368	10,15	302
2,40	10,01	305	10,12	328	10,29	379	10,15	315
2,60	10,01	319	10,12	341	10,29	391	10,16	328
2,80	10,02	333	10,13	354	10,29	403	10,16	341
3,00	10,03	345	10,13	366	10,28	416	10,17	354
3,20	10,05	359	10,14	379	10,29	427	10,17	367
3,40	10,05	372	10,14	392	10,28	439	10,17	379
3,60	10,06	384	10,15	404	10,28	450	10,17	392
3,80	10,07	397	10,15	416	10,29	463	10,18	406
4,00	10,08	409	10,15	429	10,28	474	10,18	418

Valorante CuSO₄ 9,875 10⁻³ M en medio amoniacal (1:10)
 Concentración de clorh. de moroxidina 6,667 10⁻⁴ M.

Taibla 22a.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con CuSO₄ en medio amoniacal.

v(ml)	curva V medio NaOH		curva VI medio NaOH		curva VII medio NaOH		curva VIII medio NaOH-NH ₃ (1:2)	
	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)
0,00	11,25	788	11,57	1268	11,72	1734	11,74	1772
0,20	11,26	763	11,57	1243	11,71	1709	11,74	1746
0,40	11,26	741	11,58	1218	11,72	1681	11,74	1720
0,60	11,25	718	11,56	1192	11,72	1655	11,74	1692
0,80	11,22	696	11,55	1167	11,71	1628	11,74	1665
1,00	11,19	677	11,53	1142	11,70	1601	11,74	1637
1,20	11,16	660	11,51	1118	11,69	1575	11,72	1612
1,40	11,14	645	11,49	1096	11,68	1548	11,71	1586
1,60	11,11	635	11,47	1074	11,67	1524	11,70	1561
1,80	11,09	627	11,45	1057	11,65	1503	11,69	1540
2,00	11,07	623	11,43	1042	11,64	1484	11,67	1521
2,20	11,06	621	11,42	1030	11,63	1468	11,66	1505
2,40	11,03	621	11,40	1021	11,62	1455	11,65	1491
2,60	11,02	622	11,39	1013	11,61	1443	11,64	1478
2,80	11,01	625	11,38	1006	11,59	1433	11,63	1468
3,00	10,99	629	11,36	1001	11,59	1423	11,62	1458
3,20	10,98	634	11,35	997	11,58	1414	11,61	1448
3,40	10,97	640	11,34	993	11,57	1405	11,60	1440
3,60	10,96	646	11,33	990	11,56	1398	11,58	1433
3,80	10,96	653	11,32	987	11,55	1391	11,57	1425
4,00	10,95	661	11,30	985	11,54	1385	11,57	1417

Valorante CuSO₄ 9,875 10⁻³ M en medio amoniacal (1:10)
 Concentración de clorh. de moroxidina 6,667 10⁻⁴ M.

Tabla 22b.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con CuSO₄ en medio amoniacal.

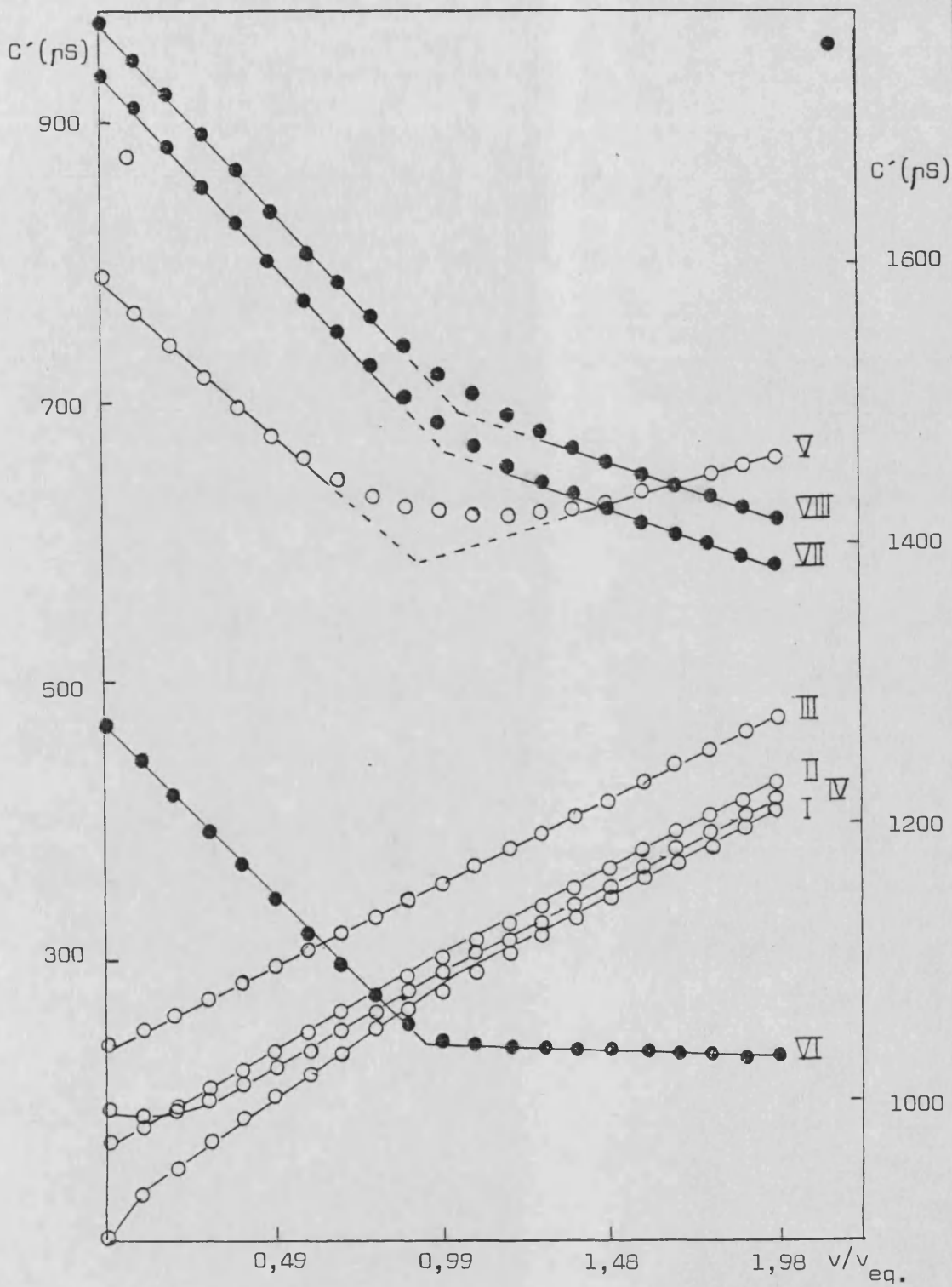


Figura 17.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de moroxidina con $CuSO_4$ en medio amoniacal (ver figuras 22a y 22b).

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NH ₃		curva III medio NaOH	
	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)	pH	C'(µS)
0,00	5,68	115	11,55	961	11,76	1442
0,20	5,43	127	11,50	931	11,74	1410
0,40	5,35	137	11,47	900	11,73	1376
0,60	5,29	147	11,45	870	11,70	1347
0,80	5,24	157	11,42	840	11,68	1316
1,00	5,21	167	11,40	811	11,67	1287
1,20	5,18	177	11,34	780	11,64	1259
1,40	5,15	187	11,30	748	11,62	1231
1,60	5,13	196	11,28	725	11,60	1205
1,80	5,12	206	11,24	715	11,58	1180
2,00	5,10	215	11,21	697	11,56	1157
2,20	5,08	225	11,17	680	11,54	1134
2,40	5,06	234	11,13	663	11,52	1113
2,60	5,05	243	11,10	649	11,50	1093
2,80	5,04	252	11,08	635	11,48	1074
3,00	5,03	261	11,03	622	11,46	1056
3,20	5,02	270	11,00	611	11,43	1037
3,40	5,01	279	10,96	601	11,41	1022
3,60	5,00	287	10,91	594	11,39	1005
3,80	4,99	297	10,87	588	11,37	990
4,00	4,98	305	10,83	582	11,35	976
4,20	4,97	313	10,80	578	11,32	964
4,40	4,96	322	10,76	573	11,30	952
4,60	4,95	331	10,71	569	11,28	942
4,80	4,95	340	10,68	567	11,26	933
5,00	4,94	348	10,63	563	11,24	923

Valorante CuSO₄ 9,875 10⁻³ M. Concentración de
clorh. de metformin 6,91 10⁻⁴ M.

Tabla 23.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas del clorhidrato de metformin con CuSO₄.

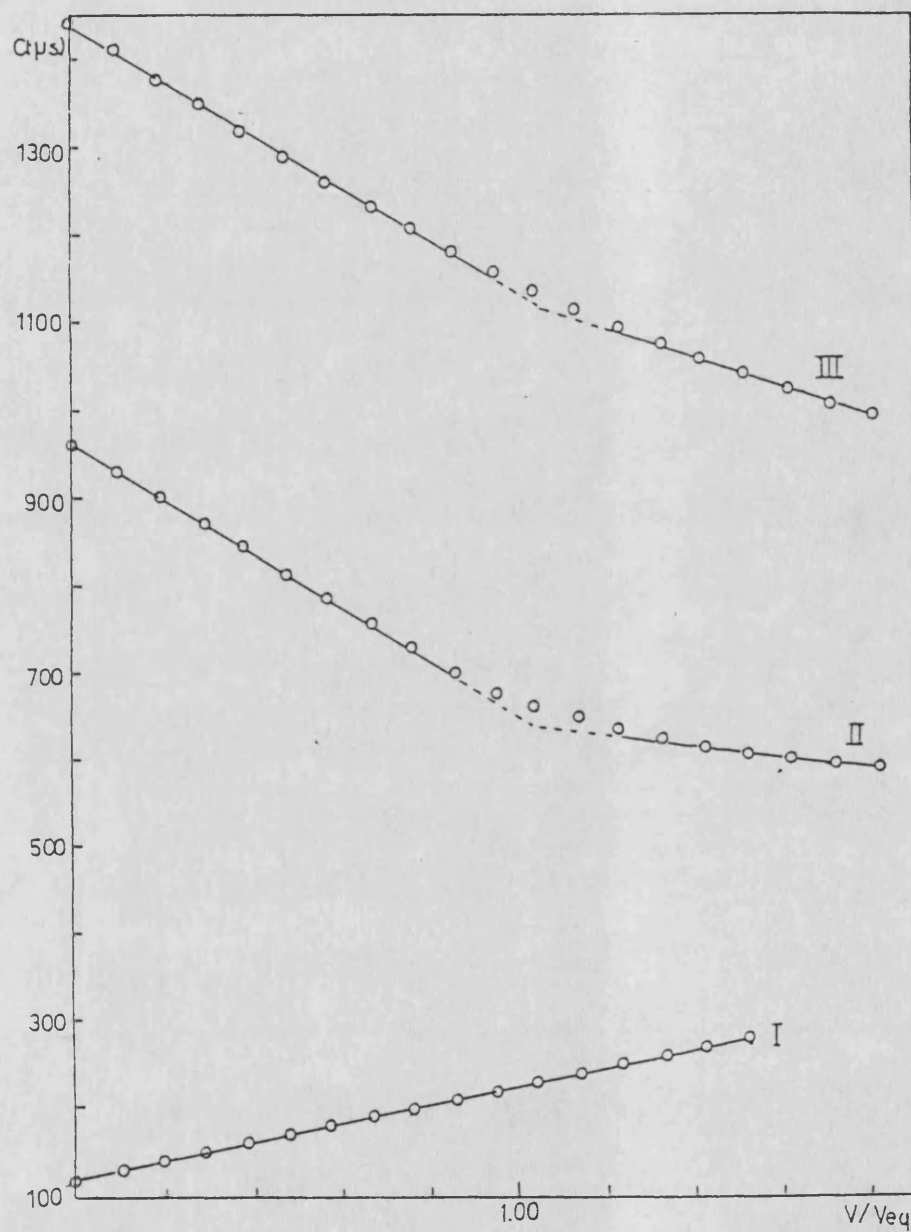


Figura 18.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas del clorhidrato de metformina con CuSO_4 (ver tabla 23).

v(ml)	curva I medio H ₂ O		curva II medio NaOH		curva III medio NaOH	
	pH	C'(pS)	pH	C'(pS)	pH	C'(pS)
0,00	6,04	95	11,48	972	11,65	1406
0,20	5,64	105	11,47	942	11,65	1377
0,40	5,52	115	11,45	913	11,63	1349
0,60	5,51	126	11,40	882	11,60	1319
0,80	5,49	135	11,38	852	11,60	1292
1,00	5,49	146	11,34	824	11,58	1264
1,20	5,47	155	11,31	794	11,56	1234
1,40	5,44	165	11,30	765	11,54	1208
1,60	5,42	174	11,26	740	11,51	1181
1,80	5,39	183	11,24	718	11,50	1157
2,00	5,37	192	11,18	700	11,48	1138
2,20	5,36	202	11,17	682	11,46	1120
2,40	5,33	211	11,14	667	11,44	1105
2,60	5,31	220	11,12	653	11,43	1090
2,80	5,30	229	11,07	639	11,41	1076
3,00	5,27	237	11,03	626	11,39	1062
3,20	5,25	247	11,01	615	11,38	1049
3,40	5,25	255	10,97	603	11,35	1037
3,60	5,23	264	10,93	594	11,34	1026
3,80	5,21	273	10,86	585	11,32	1016
4,00	5,21	281	10,82	578	11,30	1006

Valorante CuSO₄ 9,875 10⁻³ M. Concentración
de clorh. de moroxidina 6,667 10⁻⁴ M.

Tabla 24.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas del clorhidrato de moroxidina con CuSO₄.

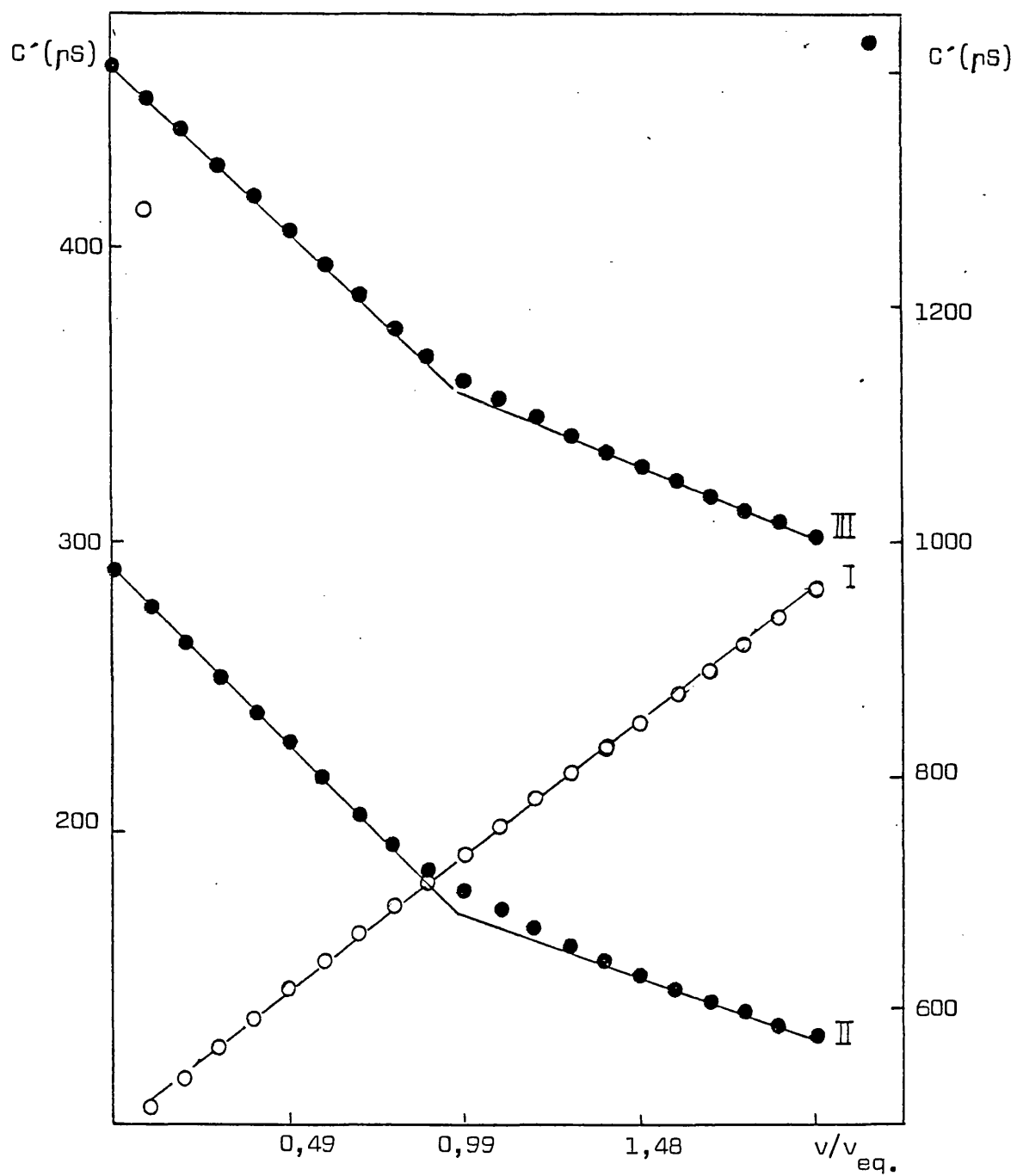


Figura 19.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas del clorhidrato de moroxidina con CuSO_4 (ver tabla 24).

v(ml)	curva I medio NaOH		curva II medio NaOH		curva III medio NaOH-NH ₃ 1:8	
	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)	pH	C' (µS)
0,00	10,95	285	11,28	418	11,12	352
0,20	10,85	266	11,22	396	11,01	343
0,40	10,75	250	11,14	376	10,94	332
0,50	10,70	244	-	-	-	-
0,60	10,63	237	11,07	356	10,85	325
0,70	10,66	231	-	-	-	-
0,80	10,52	226	11,00	339	10,80	320
0,90	10,45	221	-	-	-	-
1,00	10,40	217	10,92	325	10,71	317
1,20	10,30	211	10,85	312	10,66	316
1,40	10,19	207	10,76	301	10,61	315
1,60	10,06	203	10,68	293	10,56	316
1,80	9,88	200	10,62	287	10,53	318
2,00	9,66	198	10,56	283	10,49	320
2,20	9,28	197	10,49	279	10,44	325
2,40	8,65	200	10,42	276	10,41	329
2,60	8,09	205	10,34	272	10,37	333
2,80	7,61	211	10,24	270	10,34	337
3,00	7,34	215	10,13	267	10,29	343
3,20	7,19	221	9,98	264	-	-
3,40	7,09	226	9,80	262	-	-
3,60	7,02	232	9,53	260	-	-

Valorante Cu(Acetato)₂ 1,335 10⁻² M. Concentración del clorh. de metformin 8,06 10⁻⁴ M.

Tabla 25.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas del clorhidrato de metformin con Cu(Acetato)₂.

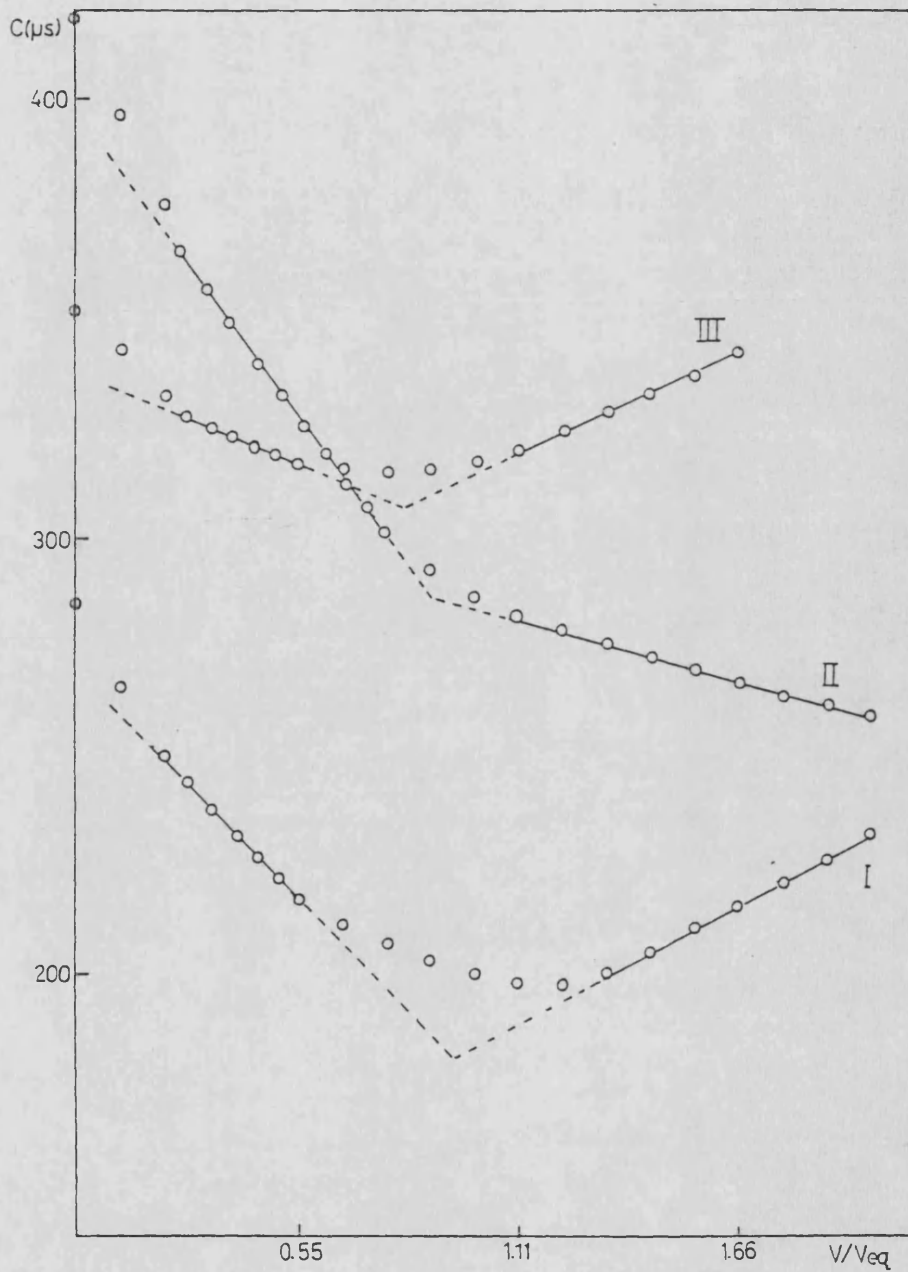


Figura 20.- Influencia del medio en las valoraciones conductimétricas del clorhidrato de metformin con $Cu(Acetato)_2$ (ver tabla 25).

II.2.3.3.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE REACTIVOS

De los resultados expuestos en el apartado anterior se eligen como medios más adecuados para la valoración los siguientes:

a).- Complejos sólidos

En primer lugar, se llevan a cabo valoraciones para concentraciones bajas de clorhexidina, del orden de 10^{-5} M, en los medios que en principio parecen óptimos (curva II de la figura 9 ; curvas IV y V de la figura 15), con el objeto de utilizar aquellas condiciones que permitan que la determinación sea lo más sensible posible.

Las condiciones que se utilizan para la realización de la curva II de la figura 9 no permiten la determinación de cantidades de biguanida del orden citado, sí permitiéndolo las utilizadas para la obtención de las curvas IV y V de la figura 15 .

A la vista de esto se concluye que el medio óptimo resulta ser el proporcionado por 3 ml de NH_4OH 0,2 M, 9 ml de NaOH 0,01 M diluído a 60 ml con etanol al 15%.

El criterio general seguido para la elección del medio más adecuado se ha basado en un compromiso entre "ángulo entre rectas" y "cantidad de la reacción".

El valorante elegido es el $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ por proporcionar menor conductividad de fondo.

b).- Complejos solubles

De la observación de las gráficas correspondientes a las valoraciones de metformina y moroxidina con $\text{Cu}(\text{II})$, se elige como medio óptimo utilizando el criterio señalado anteriormente, un pH entre



11,00 - 11,50, que se consigue con NaOH y NH_3 en relación 1:15. El amoníaco se adiciona para tamponar el pH del medio, de ese modo el incremento de pH a lo largo de la valoración no es significativo.

La sal de Cu(II) utilizada como valorante es el CuSO_4 acuoso, ya que el acetato retrasa la formación de los complejos correspondientes.

Una vez seleccionado el medio se procede a variar las concentraciones relativas de analito y valorante. El rango de clorhidrato de clorhexidina estudiado va de $3,018 \cdot 10^{-5}$ M a $4,255 \cdot 10^{-4}$ M y el de $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ utilizado como valorante va de $1,335 \cdot 10^{-3}$ M a $1,335 \cdot 10^{-2}$ M.

El intervalo de metformin estudiado va de $1,697 \cdot 10^{-4}$ a $1,697 \cdot 10^{-3}$ M y la concentración de CuSO_4 oscila entre $4,938 \cdot 10^{-3}$ y $9,938 \cdot 10^{-2}$ M.

Resultados y discusión

a).- Complejos sólidos

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 26 y en la figura 21. Se observa, que a medida que aumenta la concentración de clorhidrato de clorhexidina en el medio, el primer tramo de la valoración cambia de valores negativos de pendiente a positivos pasando por cero; este hecho es explicable teniendo en cuenta que la concentración de valorante utilizada es cada vez mayor, por lo que la conductividad de fondo irá aumentando progresivamente. Este mismo efecto explica que la pendiente del segundo tramo de la valoración sufra las mismas modificaciones.

También se observa que a medida que aumenta la cantidad de

biguanida presente en el seno de la valoración, el comienzo de la reacción se va retrasando, ya que los primeros puntos se van apartando de la recta que define el primer tramo de la determinación, esto será debido a la influencia que ejercen los complejos Cu(II)-acetato, ya que este efecto es más acusado a medida que aumenta la concentración de valorante. A este hecho también puede contribuir un cambio inicial en la concentración de hidrogeniones, ya que la solución valorante es ligeramente ácida. y los propios complejos aminados.

b).- Complejos solubles

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 27 y figura 22. Se observa que a medida que disminuye la concentración desde $1,697 \cdot 10^{-3}$ M a $1,697 \cdot 10^{-4}$ M en metformina, el ángulo entre el primer y segundo tramo de la valoración va aumentando, pasando de tener la curva forma V para una concentración de $1,697 \cdot 10^{-3}$ M a no distinguirse dos cambios de pendiente para $1,697 \cdot 10^{-4}$ M en metformina. Mientras que la pendiente del primer tramo de la valoración va disminuyendo en términos de valor absoluto, tomando siempre valores negativos, la correspondiente al segundo tramo pasa de valores positivos a negativos, hecho que es explicable teniendo en cuenta que la molaridad del valorante CuSO_4 va disminuyendo a medida que bajamos la concentración.

Las concentraciones de metformin que quedan dentro del intervalo señalado originan gráficas en forma de L más o menos abierta. A medida que aumenta la concentración del valorante y por tanto la cantidad de biguanida presente, se observa un mayor distanciamiento de los puntos iniciales de la valoración, respecto de la recta que marca el primer tramo, fenómeno que es imputable al hecho de que el pH varía en mayor proporción.

curva I		curva II		curva III		curva IV		curva V		curva VI	
v(ml)	C'(µS)	v(ml)	C'(µS)	v(ml)	C'(µS)	v(ml)	C'(µS)	v(ml)	C'(µS)	v(ml)	C'(µS)
0,00	208	0,00	226	0,00	203	0,00	212	0,00	193	0,00	200
0,10	205	0,20	223	0,40	187	0,40	205	0,40	168	0,40	171
0,20	203	0,40	220	0,80	177	0,80	201	0,60	161	0,60	165
0,30	201	0,60	215	1,00	172	1,20	196	0,70	158	0,80	162
0,40	199	0,80	212	1,20	167	1,60	192	0,80	158	1,00	163
0,50	197	1,00	209	1,40	164	2,00	188	0,90	158	1,20	164
0,60	195	1,20	206	1,60	161	2,40	183	1,00	158	1,40	167
0,70	192	1,40	204	1,80	159	2,80	179	1,10	158	1,60	169
0,80	190	1,60	201	2,00	156	3,20	175	1,20	158	1,80	173
0,90	188	1,80	199	2,20	153	3,60	170	1,30	160	2,00	177
1,00	186	2,00	196	2,40	152	4,00	166	1,40	162	2,20	181
1,10	184	2,20	194	2,60	149	4,40	162	1,50	163	2,40	186
1,20	183	2,40	192	2,80	147			1,60	164	2,60	191
1,30	181	2,60	190	3,00	147			1,80	168	2,80	196
1,40	179	2,80	188	3,20	147			2,00	171	3,00	202
1,50	177	3,00	186	3,40	147			2,20	175	3,20	206
1,60	176	3,20	185	3,60	147			2,40	180	3,40	212
1,70	175	3,40	183	3,80	147			2,60	186	3,60	218
1,80	173	3,60	182	4,00	147			2,80	190	3,80	224
1,90	172	3,80	180	4,20	147			3,00	195	4,00	229
2,00	171	4,00	179	4,40	147						
2,10	169	4,20	178								
2,20	168	4,40	177								
2,30	167	4,60	176								
C≅207,6-21,6ml r=0,999		C≅222,0-13,3ml r=0,999		C≅183,3-13,7ml r=0,999				C≅158,0 r=1		C≅149,7+12,5ml r=0,999	
C≅196,2-12,7ml r=0,998		C≅202,4-5,8ml r=0,997		C≅147,0 r=1				C≅121,7-24,4ml r=0,999		C≅120,4+27,1ml r=0,999	

Solución valorante $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,335 \cdot 10^{-3}$ M en I y II; $3,375 \cdot 10^{-3}$ M III y IV y $1,335 \cdot 10^{-2}$ M V y VI. Concentración de clorhidrato de clorhexidina (M): I, $3,018 \cdot 10^{-5}$; II, $5,762 \cdot 10^{-5}$; III, $1,504 \cdot 10^{-5}$; IV, blanco; V, $3,404 \cdot 10^{-4}$ y VI, $4,255 \cdot 10^{-4}$. Medio: 9 ml de NaOH 0,01 M, 3 ml de 0,2 M NH_3 diluido a 60 ml con etanol al 15%.

Tabla 26.- Influencia de la concentración de reactivos en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$.

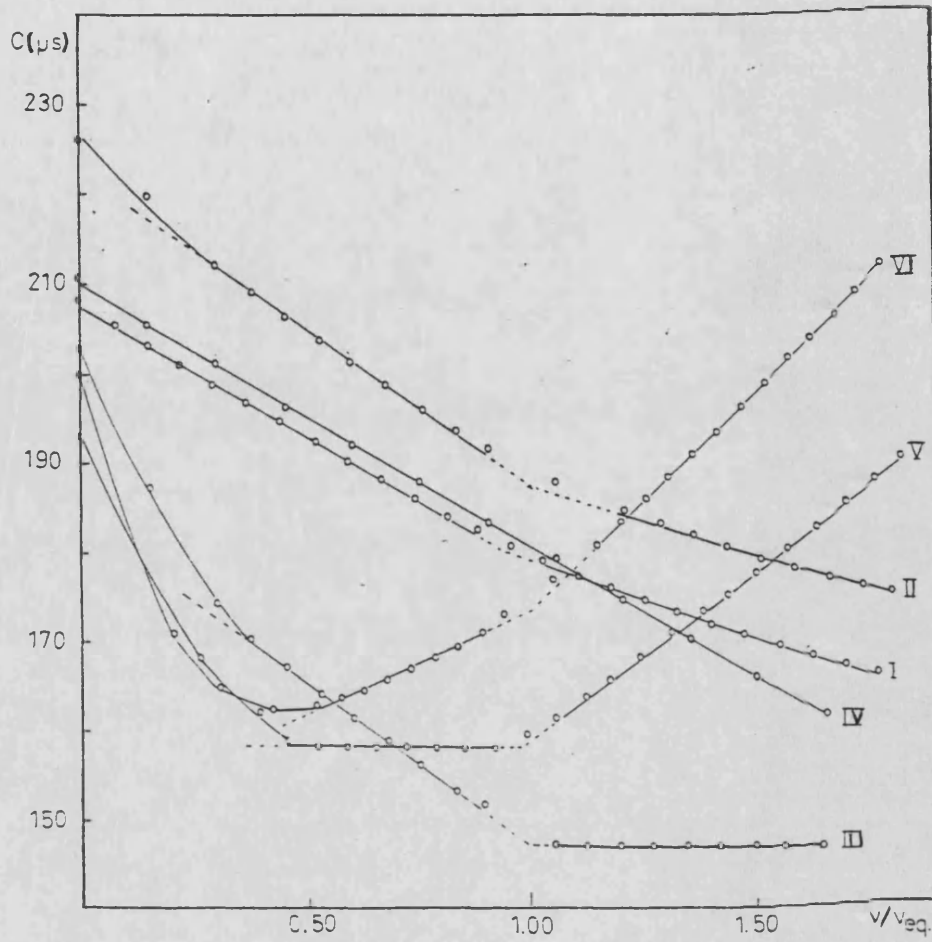


Figura 21.- Influencia de la concentración de reactivos en las valoraciones conductimétricas de clorhexidina con $Cu(Acetano)_2$ (ver tabla 26).

curva I			curva II			curva III			curva IV			curva V		
v(ml)	pH	C'(µS)	v(ml)	pH	C'(µS)	v(ml)	pH	C'(µS)	v(ml)	pH	C'(µS)	v(ml)	pH	C'(µS)
0,00	11,66	671	0,00	11,56	582	0,00	11,52	676	0,00	11,61	767	0,00	11,49	800
0,10	11,66	669	0,10	11,55	576	0,10	11,49	670	0,20	11,60	750	0,05	11,35	764
0,20	11,65	667	0,20	11,53	571	0,20	11,46	664	0,40	11,57	738	0,10	11,26	736
0,30	11,62	664	0,30	11,51	565	0,30	11,45	658	0,60	11,54	724	0,15	11,20	702
0,40	11,61	661	0,40	11,52	559	0,40	11,44	651	0,80	11,50	708	0,20	11,15	685
0,50	11,60	657	0,50	11,51	555	0,50	11,42	645	1,00	11,49	696	0,25	11,10	668
0,60	11,58	654	0,60	11,48	551	0,60	11,41	638	1,20	11,47	686	0,30	11,05	653
0,70	11,57	651	0,70	11,47	548	0,70	11,39	633	1,40	11,45	676	0,35	11,00	643
0,80	11,55	647	0,80	11,45	544	0,80	11,37	627	1,60	11,43	664	0,40	10,95	639
0,90	11,54	643	0,90	11,44	540	0,90	11,36	622	1,80	11,40	655	0,45	10,90	636
1,00	11,53	640	1,00	11,43	537	1,00	11,35	617	2,00	11,37	646	0,50	10,87	634
1,10	11,52	635	1,10	11,43	534	1,10	11,34	612	2,20	11,35	636	0,55	10,84	636
1,20	11,51	630	1,20	11,42	531	1,20	11,32	608	2,40	11,33	632	0,60	10,80	640
1,30	11,51	627	1,30	11,41	528	1,30	11,31	603	2,60	11,30	625	0,65	10,76	646
1,40	11,51	624	1,40	11,40	526	1,40	11,30	600	2,80	11,29	623	0,70	10,73	654
1,50	11,50	621	1,50	11,38	524	1,50	11,29	596	3,00	11,26	616	0,75	10,70	666
1,60	11,49	619	1,60	11,37	522	1,60	11,28	592	3,20	11,25	614	0,80	10,67	679
1,70	11,47	616	1,70	11,36	520	1,70	11,27	590	3,40	11,22	611	0,85	10,65	690
1,80	11,45	613	1,80	11,36	518	1,80	11,26	588	3,60	11,20	608	0,90	10,62	702
1,90	11,44	610	1,90	11,35	517	1,90	11,25	585	3,80	11,19	607	0,95	10,60	716
2,00	11,43	607	2,00	11,34	515	2,00	11,23	583	4,00	11,17	605	1,00	10,59	724
2,10	11,42	604	2,10	11,33	514	2,10	11,22	581	4,20	11,15	603	1,05	10,58	734
2,20	11,40	602	2,20	11,32	513	2,20	11,21	578	4,40	11,13	602	1,10	10,58	745
			2,30	11,31	512	2,30	11,19	575	4,60	11,11	601			
			2,40	11,30	511	2,40	11,18	574	4,80	11,10	599			
			2,50	11,29	510									
			2,60	11,28	509									
			2,70	11,27	508									
			C=572,5-35,0ml r=0,997			C=675,6-60,1ml r=0,999			C=748,4-51,8ml r=0,999			C=745,0-300,0ml r=0,997		
			C=535,0-10,0ml r=0,998			C=629,0-23,0ml r=0,999			C=640,9-8,8ml r=0,997			C=481,0+246,0ml r=0,9992		

Valorante CuSO_4 $4,938 \cdot 10^{-3}$ M I y II; $9,938 \cdot 10^{-3}$ M III y IV y $9,938 \cdot 10^{-2}$ M V. Concentración de metformin (M): I, $1,697 \cdot 10^{-4}$; II, $2,546 \cdot 10^{-4}$; III, $4,243 \cdot 10^{-4}$; IV, $8,485 \cdot 10^{-4}$ y V, $1,697 \cdot 10^{-3}$ M. Medio: NaOH-NH_3 (1:15).

Tabla 27.- Influencia de la concentración de reactivos en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformin con CuSO_4 .

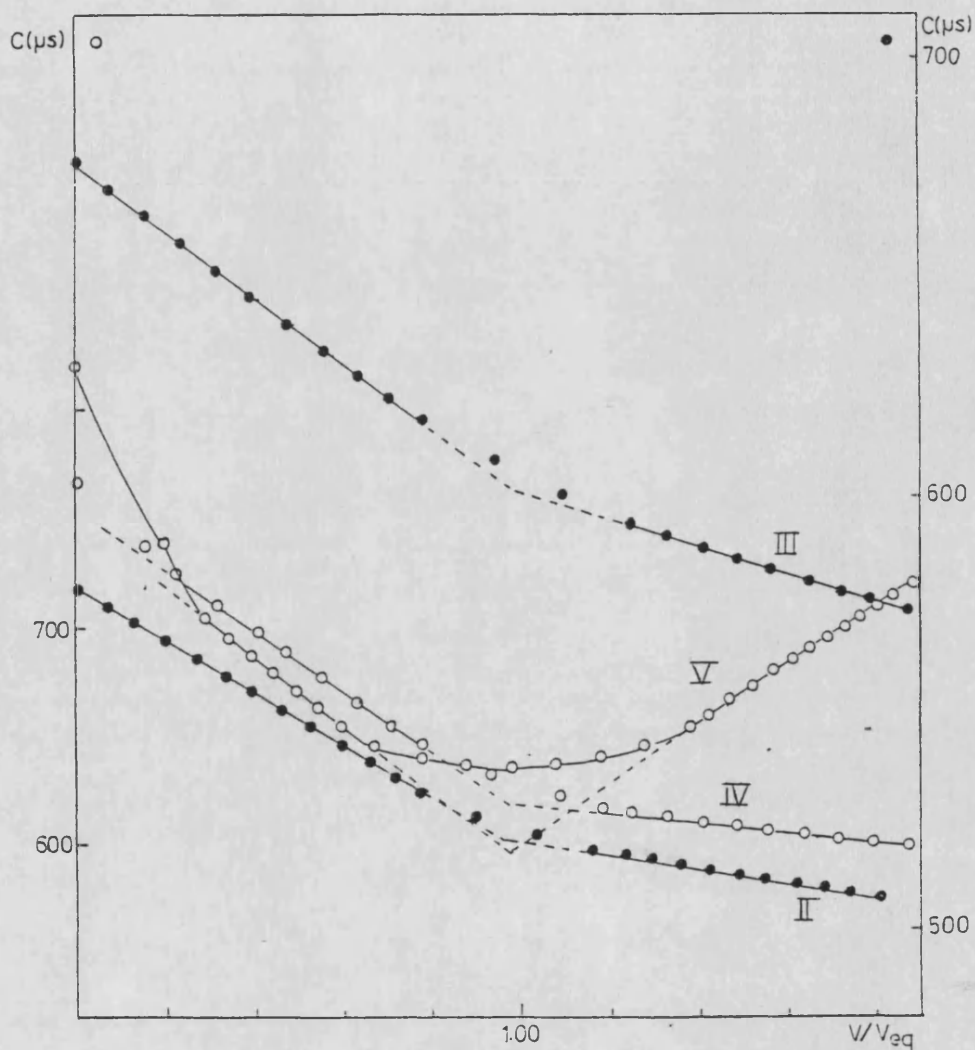


Figura 22.- Influencia de la concentración de reactivos en las valoraciones conductimétricas de clorhidrato de metformin con $CuSO_4$ (ver tabla 27).

II.2.3.4.- CARACTERISTICAS ANALITICAS

De los resultados expuestos en el apartado anterior se deduce que el procedimiento de valoración es aplicable, en principio, a todo el intervalo estudiado para el clorhidrato de clorhexidina. En cuanto al metformin, hay que decir, que no es aplicable el método para disoluciones $1,697 \cdot 10^{-4}$ M si el valorante utilizado es CuSO_4 $4,938 \cdot 10^{-3}$ M.

EXACTITUD, REPRODUCIBILIDAD E INTERVALO DE APLICACION

Método

Se estudia la exactitud, reproducibilidad e intervalo de aplicación de la determinación volumétrica de biguanidas con Cu(II), utilizando indicador conductimétrico de punto final. Para ello se realizan series de cinco experiencias para las concentraciones que corresponden al intervalo $3,018 \cdot 10^{-5}$ - $4,255 \cdot 10^{-4}$ M en clorhidrato de clorhexidina y $2,546 \cdot 10^{-4}$ - $1,697 \cdot 10^{-3}$ M en metformina, en las condiciones óptimas descritas en el apartado anterior.

Con el fin de obtener la exactitud del método los resultados se comparan con los obtenidos al utilizar el método standard (valoración en medio acético glacial con HClO_4 seguida potenciométricamente. Electrodo de referencia: calomelanos relleno con metanol saturado en KCl y electrodo indicador de vidrio).

La reproducibilidad se da en función de la desviación standard relativa s_r (%), la desviación standard media s/\sqrt{n} y de la varianza s^2 . Los valores discordantes se rechazan o no si quedan fuera del intervalo de confianza $\bar{x} \pm st$.

El número de cifras significativas dadas para la Molaridad y

el volumen, son las que están en consonancia con el error de que vienen afectadas debido a las restricciones impuestas por el material utilizado.

Utilizando las tablas de Fischer se determinan los intervalos de confianza dentro de los cuales se encontrarían representadas todas las medidas con un 95% y un 98% de probabilidad, así como los intervalos $\bar{x} \pm s/\sqrt{n} \cdot t$, para el cual el valor medio (verdadero) tiene un 95% y un 98% de probabilidad de hallarse dentro de él, y el error de este valor medio $\%E = (100/\bar{x}) (s/\sqrt{n}) t$.

Resultados

a).- Complejos sólidos

Los resultados correspondientes a las valoraciones de disoluciones de clorhidrato de clorhexidina $3,018 \cdot 10^{-5}$, $5,869 \cdot 10^{-4}$, $3,404 \cdot 10^{-4}$, y $4,255 \cdot 10^{-4}$ M se dan en las tablas 28, 29, 30, 31, 32.

La aplicación del método standard da como resultado un 99,3% de riqueza ($s_r = 0,30 \%$) para el clorhidrato de clorhexidina.

En la tabla 33 se presenta un resumen de la exactitud del método para cada una de las disoluciones de clorhidrato de clorhexidina valoradas,

Las tablas 34 y 35 muestran para cada una de las concentraciones de biguanida ensayadas, los parámetros que representan la reproducibilidad, así como la magnitud de los intervalos citados en el apartado de método. En la tabla 36 se evalúa si el método es o no correcto y si presenta errores sistemáticos.

A la vista de los resultados obtenidos se deduce que el método es aplicable en el intervalo de concentraciones que va de $5,762 \cdot 10^{-5}$ a $3,404 \cdot 10^{-4}$ M ya que los errores evaluados están dentro del orden de error imputable al material utilizado.

La reproducibilidad del método es buena, como lo demuestran los valores de "s" obtenidos para el intervalo de concentraciones estudiado

b).- Complejos solubles

Los resultados correspondientes a las valoraciones de disoluciones de metformina $2,546 \cdot 10^{-4}$, $4,243 \cdot 10^{-4}$, $8,485 \cdot 10^{-4}$ y $1,697 \cdot 10^{-3}$ M se dan en las tablas 37, 38, 39, 40.

La aplicación para la determinación de la pureza de la metformina, del método standard, da como resultado un 99,80 % ($s_r = 0,39$ %).

La exactitud del método para cada una de las disoluciones de metformina valoradas se presenta en la tabla 41.

Los parámetros que representan la reproducibilidad, así como la magnitud de los intervalos mencionados anteriormente en el apartado de método se dan en las tablas 42 y 43 para cada una de las concentraciones de biguanida ensayadas.

En la tabla 44 se evalúa si el método es ó no correcto y si presenta ó no errores sistemáticos.

A la vista de los resultados obtenidos, el método es aplicable en el intervalo de concentraciones que va de $2,546 \cdot 10^{-4}$ a $1,697 \cdot 10^{-3}$ M en metformina, ya que los errores evaluados están dentro del orden de error imputable al material utilizado. El método resulta correcto y no presenta errores sistemáticos. La reproducibilidad del método es buena tal como lo demuestran los valores de la desviación standard obtenidos para el intervalo de concentraciones estudiado.

El método propuesto presenta un compromiso entre exactitud y sensibilidad más favorable que el método standard con indicador visual de punto final (violeta cristal), hecho que se pone de mani-

fiesto observando los resultados obtenidos al aplicar ambos métodos en los intervalos de concentración que a continuación se dan:

Método standard

Intervalo ensayado.- 15,37 mg ($\% s_r = 0,57$, $\% E_r = 2,2$) a 3,84 mg de metformina ($\% s_r = 0,5$, $\% E_r = 6,8$).

Método propuesto

Intervalo ensayado.- 16,86 mg ($\% s_r = 1,66$, $\% E_r = 2.0$) a 2,53 mg de metformin ($\% s_r = 1,26$, $\% E_r = 1,2$).

Valoración	v_{val}	E_a	$E_r(\%)$	M	$E_a 10^5$	$E_r(\%)$
1	1,28	-0,07	5,2	$2,848 \cdot 10^{-5}$	-0,17	5,6
2	1,29	-0,06	4,4	$2,870 \cdot 10^{-5}$	-0,15	4,9
3	1,30	-0,05	3,7	$2,893 \cdot 10^{-5}$	-0,13	4,3
4	1,29	-0,06	4,4	$2,870 \cdot 10^{-5}$	-0,15	4,9
5	1,32	-0,03	2,2	$2,937 \cdot 10^{-5}$	-0,08	2,7
\bar{x}	1,30		3,7	$2,884 \cdot 10^{-5}$		4,4

Concentración de clorhidrato de clorhexidina $3,018 \cdot 10^{-5}$ M

Valorante $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,335 \cdot 10^{-3}$ M. Medio: 9 ml de NaOH 0,01 M, 3 ml de NH_3 0,2 M diluído a 60 ml con etanol al 15%.

Tabla 28.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $3,02 \cdot 10^{-5}$ M.

Valoración	v_{val}	E_a	$E_r(\%)$	M	$E_a 10^5$	$E_r(\%)$
1	2,56	-0,03	1,16	$5,696 \cdot 10^{-5}$	-0,07	1,21
2	2,61	+0,02	0,77	$5,807 \cdot 10^{-5}$	+0,05	0,87
3	2,56	-0,03	1,16	$5,696 \cdot 10^{-5}$	-0,07	1,21
4	2,57	-0,02	0,77	$5,718 \cdot 10^{-5}$	-0,04	0,70
5	2,60	+0,01	0,39	$5,785 \cdot 10^{-5}$	+0,02	0,35
\bar{x}	2,58		0,40	$5,740 \cdot 10^{-5}$		0,40

Concentración de Clorhidrato de clorhexidina $5,762 \cdot 10^{-5}$ M.

Valorante $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,335 \cdot 10^{-3}$ M. Medio: 9 ml de NaOH 0,01 M, 3 ml de NH_3 0,2 M diluído a 60 ml con etanol al 15%.

Tabla 29.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $5,76 \cdot 10^{-5}$ M.

Valoración	v_{val}	E_a	E_r (%)	M	$E_a \cdot 10^4$	E_r (%)
1	2,69	0,02	0,75	$1,513 \cdot 10^{-4}$	0,010	0,7
2	2,67	0,00	0,00	$1,502 \cdot 10^{-4}$	0,002	0,1
3	2,64	-0,03	1,12	$1,485 \cdot 10^{-4}$	0,020	1,3
4	2,65	-0,02	0,75	$1,491 \cdot 10^{-4}$	0,013	0,9
5	2,65	-0,02	0,75	$1,491 \cdot 10^{-4}$	0,013	0,9
\bar{x}	2,66		0,40	$1,496 \cdot 10^{-4}$		0,5

Concentración de clorhidrato de clorhexidina $1,504 \cdot 10^{-4}$ M.

Valorante $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $3,375 \cdot 10^{-3}$ M. Medio: 9 ml de NaOH 0,01 M, 3 ml de NH_3 0,2 M diluido a 60 ml con etanol al 15%.

Tabla 30.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $1,50 \cdot 10^{-4}$ M.

Valoración	v_{val}	E_a	E_r (%)	M	$E_a \cdot 10^4$	E_r (%)
1	1,51	-0,02	1,3	$3,360 \cdot 10^{-4}$	-0,04	1,2
2	1,49	-0,04	2,6	$3,315 \cdot 10^{-4}$	-0,09	2,6
3	1,50	-0,03	1,9	$3,338 \cdot 10^{-4}$	-0,07	2,0
4	1,51	-0,02	1,3	$3,360 \cdot 10^{-4}$	-0,04	1,2
5	1,54	+0,01	0,7	$3,427 \cdot 10^{-4}$	0,02	0,6
\bar{x}	1,51		1,3	$3,360 \cdot 10^{-4}$		1,2

Concentración de clorhidrato de clorhexidina $3,404 \cdot 10^{-4}$ M.

Valorante $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,335 \cdot 10^{-2}$ M. Medio: 9 ml de NaOH 0,01 M, 3 ml de NH_3 0,2 M diluido a 60 ml con etanol al 15%.

Tabla 31.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $3,40 \cdot 10^{-4}$ M.

Valoración	v_{val}	E_a	$E_r(\%)$	M	$E_a \cdot 10^4$	$E_r(\%)$
1	2,00	0,09	4,7	$4,450 \cdot 10^{-4}$	0,20	4,7
2	1,95	0,04	2,1	$4,339 \cdot 10^{-4}$	0,08	1,9
3	1,96	0,05	2,6	$4,361 \cdot 10^{-4}$	0,11	2,6
4	1,97	0,06	3,1	$4,383 \cdot 10^{-4}$	0,13	3,1
5	1,95	0,04	2,1	$4,339 \cdot 10^{-4}$	0,08	1,9
\bar{x}	1,97		3,1	$4,374 \cdot 10^{-4}$		2,8

Concentración de clorhidrato de clorhexidina $4,255 \cdot 10^{-4}$ M.

Valorante $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,335 \cdot 10^{-2}$ M. Medio: 9 ml de NaOH 0,01 M, 3 ml de NH_3 0,2M diluído a 60 ml con etanol al 15%.

Tabla 32.- Exactitud de la determinación conductimétrica de clorhexidina $4,23 \cdot 10^{-4}$ M.

M_{val}	v_{eq}	\bar{v}_f	$\bar{E}_r(\%)$	$M_{añadida}$	$M_{hallada}$	$\bar{E}_r(\%)$
$1,335 \cdot 10^{-3}$	1,35	1,30	3,7	$3,018 \cdot 10^{-5}$	$2,884 \cdot 10^{-5}$	4,4
$1,335 \cdot 10^{-3}$	2,59	2,58	0,4	$5,762 \cdot 10^{-5}$	$5,740 \cdot 10^{-5}$	0,4
$3,375 \cdot 10^{-3}$	2,67	2,66	0,4	$1,504 \cdot 10^{-4}$	$1,496 \cdot 10^{-4}$	0,5
$1,335 \cdot 10^{-2}$	1,53	1,51	1,3	$3,404 \cdot 10^{-4}$	$3,360 \cdot 10^{-4}$	1,2
$1,335 \cdot 10^{-2}$	1,91	1,97	3,0	$4,255 \cdot 10^{-4}$	$4,374 \cdot 10^{-4}$	2,8

Tabla 33.- Exactitud del método

\bar{M}	s^2	s_r (%)	s/\sqrt{n}	P = 0,05			P = 0,02		
				\bar{M}_{tst}	\bar{M}_{tst}/\sqrt{n}	E(%)	\bar{M}_{tst}	\bar{M}_{tst}/\sqrt{n}	E(%)
$2,884 \cdot 10^{-5}$	$1,144 \cdot 10^{-13}$	1,17	$1,51 \cdot 10^{-7}$	$(2,88 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$	$(2,88 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	1,35	$(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(2,88 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$	1,77
$5,740 \cdot 10^{-5}$	$2,720 \cdot 10^{-13}$	0,91	$2,33 \cdot 10^{-7}$	$(5,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(5,74 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	1,04	$(5,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(5,74 \pm 0,08) \cdot 10^{-5}$	1,37
$1,496 \cdot 10^{-4}$	$1,238 \cdot 10^{-12}$	0,74	$4,98 \cdot 10^{-7}$	$(1,50 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$	$(1,50 \pm 0,01) \cdot 10^{-4}$	0,86	$(1,50 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	$(1,50 \pm 0,02) \cdot 10^{-4}$	1,12
$3,360 \cdot 10^{-4}$	$1,750 \cdot 10^{-11}$	1,24	$1,87 \cdot 10^{-6}$	$(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(3,36 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	1,43	$(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(3,36 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	1,87
$4,374 \cdot 10^{-4}$	$2,190 \cdot 10^{-11}$	1,05	$2,06 \cdot 10^{-6}$	$(4,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(4,37 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	1,21	$(4,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(4,37 \pm 0,07) \cdot 10^{-4}$	1,60

Tabla 34.- Reproducibilidad de los resultados respecto a la Molaridad del Clorhidrato de Clorhexidina.

\bar{v}	s^2	s_r (%)	s/\sqrt{n}	P = 0,05			P = 0,02		
				\bar{v}_{tst}	\bar{v}_{tst}/\sqrt{n}	E(%)	\bar{v}_{tst}	\bar{v}_{tst}/\sqrt{n}	E(%)
1,30	$2,3 \cdot 10^{-4}$	1,17	$6,78 \cdot 10^{-3}$	$1,30 \pm 0,04$	$1,30 \pm 0,02$	1,34	$1,30 \pm 0,05$	$1,30 \pm 0,02$	1,76
2,58	$5,5 \cdot 10^{-4}$	0,91	$1,05 \cdot 10^{-2}$	$2,58 \pm 0,06$	$2,58 \pm 0,03$	1,20	$2,58 \pm 0,08$	$2,58 \pm 0,04$	1,37
2,66	$4,0 \cdot 10^{-4}$	0,75	$8,94 \cdot 10^{-3}$	$2,66 \pm 0,02$	$2,66 \pm 0,02$	0,86	$2,66 \pm 0,07$	$2,66 \pm 0,03$	1,13
1,51	$3,5 \cdot 10^{-4}$	1,24	$8,37 \cdot 10^{-3}$	$1,51 \pm 0,04$	$1,51 \pm 0,02$	1,42	$1,51 \pm 0,06$	$1,51 \pm 0,03$	1,86
1,97	$4,3 \cdot 10^{-4}$	1,05	$9,27 \cdot 10^{-3}$	$1,97 \pm 0,05$	$1,97 \pm 0,03$	1,58	$1,97 \pm 0,07$	$1,97 \pm 0,03$	1,58

Tabla 35.- Reproducibilidad de los resultados respecto al volumen final gastado de valorante.

M_{val}	v_{eq}	v_f	t_{exp}	t'_{exp}	$t_{teorico}$	Aplicabilidad	Error sistemático
$1,335 \cdot 10^{-3}$	1,35	1,30	3,297	7,375	2,776	No correcto	si
$1,335 \cdot 10^{-3}$	2,59	2,58	0,426	0,952	2,776	correcto	no
$3,375 \cdot 10^{-3}$	2,67	2,66	0,500	1,119	2,776	correcto	no
$1,335 \cdot 10^{-2}$	1,53	1,51	1,069	2,389	2,776	correcto	no
$1,335 \cdot 10^{-2}$	1,91	1,97	2,893	6,472	2,776	No correcto	si

Evaluación del error sistemático.

Tabla 36

Valoración	v_{val}	E_a	E_r (%)	M	$E_a \cdot 10^4$	E_r (%)
1	1,55	0,00	0,0	$2,551 \cdot 10^{-4}$	0,005	0,02
2	1,52	-0,03	1,9	$2,502 \cdot 10^{-4}$	-0,04	1,6
3	1,50	-0,05	3,2	$2,469 \cdot 10^{-4}$	-0,07	2,7
4	1,54	-0,01	0,7	$2,535 \cdot 10^{-4}$	-0,01	0,4
5	1,53	-0,02	1,3	$2,518 \cdot 10^{-4}$	-0,03	1,2
\bar{x}	1,53		1,3	$2,515 \cdot 10^{-4}$		1,2

Concentración de clorh. de metformin $2,546 \cdot 10^{-4}$ M. Val. CuSO_4
 $4,938 \cdot 10^{-3}$ M. Medio: NH_3 -NaOH (15:1), pH aproximadamente 11,50.

Tabla 37.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformin $2,55 \cdot 10^{-4}$ M.

Valoración	v_{val}	E_a	E_r (%)	M	$E_a \cdot 10^4$	E_r (%)
1	1,28	0,00	0,0	$4,240 \cdot 10^{-4}$	0,003	0,07
2	1,28	0,00	0,0	$4,240 \cdot 10^{-4}$	0,003	0,07
3	1,26	-0,02	1,6	$4,174 \cdot 10^{-4}$	0,07	1,6
4	1,25	-0,03	2,3	$4,141 \cdot 10^{-4}$	0,1	2,3
5	1,26	-0,02	1,6	$4,174 \cdot 10^{-4}$	0,07	1,6
\bar{x}	1,27		0,8	$4,194 \cdot 10^{-4}$		1,1

Concentración de clorh. de metformin: $4,243 \cdot 10^{-4}$ M. Val. CuSO_4
 $9,938 \cdot 10^{-3}$ M. Medio: NH_3 -NaOH (15:1), pH aproximadamente 11,50.

Tabla 38.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformin $4,24 \cdot 10^{-4}$ M.



Valoración	V _{val}	E _a	E _r (%)	M	E _a	E _r (%)
1	2,53	-0,03	1,2	8,381 · 10 ⁻⁴	-0,1	1,2
2	2,50	-0,06	2,3	8,280 · 10 ⁻⁴	-0,2	2,4
3	2,55	-0,01	0,4	8,447 · 10 ⁻⁴	-0,04	0,5
4	2,54	-0,02	0,8	8,414 · 10 ⁻⁴	-0,07	0,8
5	2,55	-0,01	0,4	8,447 · 10 ⁻⁴	-0,04	0,5
\bar{x}	2,54		0,8	8,394 · 10 ⁻⁴		1,1

Concentración de clorh. de metformin 8,485 · 10⁻⁴ M. Val. CuSO₄ 9,938 · 10⁻³ M. Medio: NH₃-NaOH (15:1), pH aproximadamente 11,50.

Tabla 39.- Exactitud de la determinación conductimétrica de metformin 8,49 · 10⁻⁴ M.

Valorante	v _{val}	E _a	E _r (%)	M	E _a	E _r (%)
1	0,49	0,02	3,2	1,623 · 10 ⁻³	-0,07	3,5
2	0,50	0,01	1,9	1,656 · 10 ⁻³	-0,04	2,3
3	0,50	0,01	1,9	1,656 · 10 ⁻³	-0,04	2,3
4	0,51	0,00	0,0	1,689 · 10 ⁻³	-0,01	0,5
5	0,51	0,00	0,0	1,689 · 10 ⁻³	-0,01	0,5
\bar{x}	0,50		1,9	1,663 · 10 ⁻³		2,0

Concentración de clorh. de metformin 1,697 · 10⁻³ M. Val. CuSO₄ 9,938 · 10⁻² M. Medio NH₃-NaOH (15:1), pH aproximadamente 11,50.

Tabla 40.- Exactitud en la determinación conductimétrica de metformin 1,70 · 10⁻³ M.

M valorante	v _{eq}	\bar{v}_f	\bar{E}_r (%)	M añadida	$\bar{M}_{hallada}$	\bar{E}_r (%)
$4,938 \cdot 10^{-3}$	1,55	1,53	1,3	$2,546 \cdot 10^{-4}$	$2,515 \cdot 10^{-4}$	1,2
$9,938 \cdot 10^{-3}$	1,28	1,27	0,8	$4,243 \cdot 10^{-4}$	$4,194 \cdot 10^{-4}$	1,1
$9,938 \cdot 10^{-3}$	2,56	2,54	0,8	$8,485 \cdot 10^{-4}$	$8,394 \cdot 10^{-4}$	1,1
$9,938 \cdot 10^{-2}$	0,51	0,50	1,9	$1,697 \cdot 10^{-3}$	$1,663 \cdot 10^{-3}$	2,0

Tabla 41.- Exactitud del método.

\bar{M}	s^2	s_r (%)	s/\sqrt{n}	P = 0,05			P = 0,02		
				\bar{M}_{tst}	M_{tst}/\sqrt{n}	E(%)	M_{tst}	M_{tst}/\sqrt{n}	E(%)
$2,515 \cdot 10^{-4}$	$9,98 \cdot 10^{-12}$	1,26	$1,412 \cdot 10^{-6}$	$(2,52 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$	$(2,52 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	1,56	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(2,52 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	2,00
$4,194 \cdot 10^{-4}$	$1,96 \cdot 10^{-11}$	1,06	$1,98 \cdot 10^{-6}$	$(4,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(4,19 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$	1,31	$(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(4,19 \pm 0,07) \cdot 10^{-4}$	1,77
$8,394 \cdot 10^{-4}$	$4,80 \cdot 10^{-11}$	0,82	$3,10 \cdot 10^{-6}$	$(8,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(8,39 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$	1,02	$(8,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(8,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	1,38
$1,663 \cdot 10^{-3}$	$7,62 \cdot 10^{-10}$	1,66	$1,23 \cdot 10^{-5}$	$(1,66 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$	$(1,66 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$	2,00	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(1,66 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	2,60

Tabla 42.- Reproducibilidad de los resultados respecto a la molaridad de metformina

\bar{v}	s^2	% s_r	s/\sqrt{n}	P = 0,05			P = 0,02		
				$\bar{v} \pm st$	$\bar{v} \pm st/\sqrt{n}$	E(%)	$\bar{v} \pm st$	$\bar{v} \pm st/\sqrt{n}$	E(%)
1,53	$3,7 \cdot 10^{-4}$	1,26	$8,6 \cdot 10^{-3}$	(1,53±0,05)	(1,53±0,02)	1,56	(1,53±0,07)	(1,53±0,03)	2,00
1,27	$1,8 \cdot 10^{-4}$	1,06	$6,0 \cdot 10^{-3}$	(1,27±0,04)	(1,27±0,02)	1,31	(1,27±0,05)	(1,27±0,02)	1,77
2,54	$4,3 \cdot 10^{-4}$	0,82	$9,3 \cdot 10^{-3}$	(2,54±0,06)	(2,54±0,03)	1,01	(2,54±0,08)	(2,54±0,04)	1,37
0,50	$7,0 \cdot 10^{-5}$	1,67	$3,7 \cdot 10^{-3}$	(0,50±0,02)	(0,50±0,01)	2,00	(0,50±0,03)	(0,50±0,01)	2,80

Reproducibilidad de los resultados respecto al volumen final gastado de valorante.

Tabla 43

$M_{\text{valorante}}$	v_{eq}	v_f	t_{exp}	t'_{exp}	$t_{\text{teórico}}$	Aplicabilidad	Error sistemático
$4,938 \cdot 10^{-3}$	1,55	1,53	1,040	2,325	2,776	correcto	no
$9,938 \cdot 10^{-3}$	1,28	1,27	0,745	1,667	2,776	correcto	no
$9,938 \cdot 10^{-3}$	2,56	2,54	0,964	2,157	2,776	correcto	no
$9,938 \cdot 10^{-2}$	0,51	0,50	1,196	2,674	2,776	correcto	no

Evaluación del error sistemático

Tabla 44

II.2.3.5.- INFLUENCIA DE ESPECIES EXTRAÑAS

Metodo

Se procede a la valoración de clorhidrato de clorhexidina y metformina en presencia de sustancias extrañas, y que normalmente se encuentran junto al analito en los productos farmacéuticos (ácido ascórbico, benzocaína, ácido acetilsalicílico y sacarosa) y elige un "techo" de 100 veces la concentración de analito, ó en su defecto, un error en la determinación de biguanida del 3%.

Las soluciones de ácido ascórbico y acetilsalicílico se neutralizan con NaOH antes de su utilización. La benzocaína se prepara en solución etanólica.

Se utiliza una concentración de clorhidrato de clorhexidina de $1,50 \cdot 10^{-4}$ M, como valorante $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ $3,59 \cdot 10^{-3}$ M y el medio se hace óptimo (9 ml. de NaOH 0,01 M, 3 ml de NH_3 0,02 M diluido a 60 ml con etanol al 15%).

Las soluciones de metformin utilizadas son $8,49 \cdot 10^{-4}$ M, como valorante se utiliza CuSO_4 $9,94 \cdot 10^{-3}$ M y el medio se ajusta a pH aproximadamente 11,50 con NaOH : NH_3 (1:15).

Se realizan tres replicas para cada valoración.

Resultados y discusión

a) Complejos sólidos

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 45

El ácido ascórbico no interfiere aun en un exceso de 100 veces sobre el clorhidrato de clorhexidina, mientras que la sacarosa no molesta cuando esta presente en un exceso de 50 veces.

La benzocaína y el ácido acetilsalicílico no interfieren cuando su concentración es 10 veces superior a la de la biguanida.

Las gráficas obtenidas son iguales a las obtenidas para la clor-

hexidina, pero desplazadas a valores de conductividad superiores para el caso del ácido ascórbico y el ácido acetilsalicílico, mientras que la sacarosa y benzocaína modifican la forma de la curva, disminuyendo en pequeño grado el ángulo entre las dos rectas correspondientes a los dos tramos de la valoración, diferencia que no es significativa.

b) Complejos solubles:

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 46

A diferencia de lo que ocurre para el caso anterior, el ácido ascórbico no molesta cuando su concentración es 10 veces menor que la correspondiente a la biguanida. Esto es explicable teniendo en cuenta el efecto que el Cu(II) genera sobre las disoluciones de ácido ascórbico en medio básico, acelerando su descomposición; en el caso de la formación de complejos sólidos, el Cu(II) pasa a formar parte de otra fase, no permaneciendo en la solución, con lo que el efecto señalado se anula, mientras que en el caso de la formación de complejos solubles al quedar el Cu(II) en la solución, ambas reacciones compiten influyendo en la determinación de metformin.

La sacarosa no interfiere cuando su concentración es 100 veces superior a la biguanida, la determinación admite 15 veces de exceso de ácido acetilsalicílico. La benzocaína no interfiere; en las condiciones de trabajo solo puede existir disuelta en una concentración doble a la correspondiente al metformin, si la cantidad es superior precipita.

Las gráficas obtenidas son iguales a las que se obtienen cuando el metformin es la única especie que existe en solución, excepto para el caso del ácido ascórbico que en vez de tomar la curva forma de L, lo hace de V, al aumentar la pendiente del segundo tramo de la valoración, por dar un balance más positivo los iones que dan lugar a la conductividad en este caso.

Clor. clorhexidina (M) añadido	Especie Interferente	Concentración de Interferente (M)	Clor. Clorhexidina (M) hallada	% E _r
1.50 10 ⁻⁴	Ac. Ascórbico	1.500 10 ⁻²	1.48 10 ⁻⁴	1.1
1.50 10 ⁻⁴	Sacarosa	7.49 10 ⁻³	1.53 10 ⁻⁴	2.4
1.50 10 ⁻⁴	Ac. Acetil - salicílico	1.50 10 ⁻³	1.49 10 ⁻⁴	0.7
1.50 10 ⁻⁴	Benzocaina	1.50 10 ⁻³	1.46 10 ⁻⁴	2.7

Tabla 45. - Estudio de interferencias para el clorhidrato de chlorhexidina.

Metformina (M) añadida	Especie Interferente	Concentración de Interferente (M)	Metformina (M) hallada	% E _r
8,49 10 ⁻⁴	Ac. Ascorbico	8.5 10 ⁻⁵	8.32 10 ⁻⁴	1.9
8.49 10 ⁻⁴	Sacarosa	8.49 10 ⁻²	8.61 10 ⁻⁴	1.5
8.49 10 ⁻⁴	Ac. Acetil - salicílico	1.27 10 ⁻²	8.26 10 ⁻⁴	2.7
8.49 10 ⁻⁴	Benzocaina	1.70 10 ⁻³	8.22 10 ⁻⁴	3.0

Tabla 46. - Estudio de interferencias para la metformina.

II.2.3.6.- PREPARADOS FARMACEUTICOS

Se procede a la determinación del contenido en biguanidas en diversos medicamentos, la bondad del valor obtenido se deduce por comparación con los valores declarados, así como los obtenidos utilizando la valoración con HClO_4 en medio acético glacial.

Los preparados farmaceuticos utilizados y su tratamiento se expone a continuación:

HIBITANE SOLUCION CONCENTRADA AL 5 % (Digluconato de clorhexidina).

Método propuesto:

Se toman 4 ml de solución de Hibitane al 5% diluída 10 veces con agua destilada, se añaden 3 ml de NH_3 0.2 M, 9 ml de NaOH 0.01 M y se lleva a 60 ml haciendose el medio 15% etanólico; la disolución resultante se valora con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,35 \cdot 10^{-2}$ M.

Para la aplicación del método standard se propone el siguiente tratamiento previo de la muestra:

Se toma 1 ml de Hibitane 5 % , se lleva a unos 20 ml con agua destilada, el medio se hace 1 M en NaOH con lo que precipita la clorhexidina en su forma de base libre. Se separa el sólido blanco formado por filtración en placa porosa del número 5 y se seca a 110°C durante dos horas. A continuación se disuelve el precipitado con ácido acético glacial y se procede a su valoración con HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M, utilizando indicador potenciométrico de punto final.

PROGUANIL

Método propuesto:

Se toman 4,5 ml de una solución que contiene 0.8822g/l de proguanil, se añaden 3 ml de NH_3 0.2 M, 9 ml de NaOH 0,01 M y se lleva a 60 ml, haciendose el medio 15 % etanólico procediendose a su valoración con $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $2.80 \cdot 10^{-3}$ M.

Método standard:

Se toman 5 ml de una solución de proguanil en acético glacial que contiene 4.72 g/l, se añaden 5 ml de HgCl_2 5 % y se procede a su valoración con HClO_4 $9.21 \cdot 10^{-2}$ M utilizando indicador potenciométrico de punto final.

CGULDINA (Moroxidina)

Método propuesto:

Alrededor de 3,5 g de muestra pulverizada y homogeneizada en mortero de vidrio se pesan con una precisión de 0,0001 g y se disuelven en 250 ml de agua destilada. Para eliminar el ácido ascórbico se toman 50 ml de disolución y se añaden 5 ml de H_2O_2 3%, se mantiene en ebullición 15 min, se enfría y se lleva el volumen a 100 ml. Se toman 20 ml de la muestra así tratada, se añade NaOH 0.06 M y NH_3 2 M en proporción 1:15 (pH 11.00-11.50) y se lleva el volumen a 60 ml, valorándose con CuSO_4 $9.94 \cdot 10^{-3}$ M.

El método standard conduce a resultados erróneos.

GLUCOPHAGE tabletas (Metformin)

Método propuesto:

Alrededor de 0,9 g de muestra pulverizada y homogeneizada en mortero de vidrio se pesan con una precisión de 0.0001 g y se disuelven en 500 ml de agua destilada. Se toman 5 ml de la solución, se añade NaOH 0,06 M y NH_3 2 M en relación 1:15 (pH 11.00-11.50) y se lleva el volumen a 60 ml valorándose con CuSO_4 $9.94 \cdot 10^{-3}$ M.

Método standard:

Se pesan alrededor de 0.05 g del medicamento pulverizado y homogeneizado en mortero de vidrio, con una precisión de 0.0001 g;

se disuelven en ácido acético glacial, se añaden 5 ml de HgCl_2 y se valoran con HClO_4 $9.44 \cdot 10^{-2}$ M utilizando indicador potenciométrico de punto final.

Para cada determinación se realizan 3 valoraciones.

Se aplica el método de Vrestal et al. a las curvas de valoración obtenidas con el objeto de determinar el intervalo de confianza en la determinación del punto final. (184).

El mencionado método se basa en las siguientes consideraciones: Los límites de confianza para un nivel de seguridad determinado, se presentan como dos ramas de curva a ambos lados de la recta ajustada, de forma que la mínima distancia entre ellas corresponde a $x_i = \bar{x}$. Vrestal propone un método simplificado, supone dos rectas definitorias de la zona de confianza, asíntóticas a las ramas de las curvas y que se cortan en el punto (\bar{x}, \bar{y}) . El intervalo de confianza del punto final queda determinado por la intersección de estas dos rectas de confianza. La expresión resultante es:

$$IC = 2 \left| \frac{K(b_1 - b_2) + K\bar{x}(a_1 - a_2)}{(a_1 - a_2)^2 - K^2} \right|$$

donde:

$$K = s_{a1}t_1 - s_{a2}t_2$$

$$K_{\bar{x}} = s_{a1}t_1\bar{x}_1 - s_{a2}t_2\bar{x}_2$$

siendo:

$$s_{a1} = \left[\frac{\sum_1^n (a_1x_i + b_1 - y_i)^2}{(n_1 - 2) \left| \sum_1^n (x_i - \bar{x}_i)^2 \right|} \right]^{1/2}$$

$$y \quad s_{a2} = \left[\frac{\sum_1^n (a_2 x_i + b_1 - y_i)^2}{(n_2 - 2) \left| \sum_1^n (x_i - \bar{x}_2)^2 \right|^{1/2}} \right]^{1/2}$$

siendo:

t_1, t_2 .- los valores de la abscisa de la distribución de Student para $\nu = n_1 - 2$ tomados con un nivel de significación α .

n_1, n_2 .- número de puntos tomados para ajustar la recta anterior (n_1) y posterior (n_2) al punto final.

\bar{x}_1, \bar{x}_2 .- media aritmética de las abscisas de los puntos que intervienen en el ajuste.

Resultados

Los resultados obtenidos en la aplicación del método standard y el propuesto a los distintos medicamentos se dan en la tabla 47. Se observa una gran similitud entre las determinaciones por ambos métodos.

La cuantitividad de la precipitación de la clorhexidina en su forma de base libre se comprueba realizando el mismo tratamiento a una solución de clorhexidina (digluconato) al 20 % donada por ICI Farma (boletín de control ICI Farma 19,8 %; precipitación propuesta 19.3%). También se ha determinado el digluconato de clorhexidina que contiene el Híbitane, según el método propuesto por la Farmacopea Británica para la solución al 20 %, conduciendo a un resultado del 4.5 % igual al obtenido por el procedimiento conductimétrico propuesto.

Las gráficas correspondientes a las distintas valoraciones se dan en las figuras 23, 24, 25, 26.

La aplicación del método de Vrestal da un intervalo de confianza para la determinación de digluconato de clorhexidina en Hibitane al 5 % solución concentrada, de 0,14 ml de $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $1,35 \cdot 10^{-2}$ M para un volumen final de 1,48 ml y un nivel de probabilidad del 95 %. Para la determinación de proguanil resulta ser de 0,10 ml de $\text{Cu}(\text{Acetato})_2$ $2,80 \cdot 10^{-3}$ M para un volumen final de 2,40 ml y el mismo nivel de probabilidad.

El intervalo de confianza para la determinación de moroxidina en tabletas de couldina resulta ser de 0,10 ml de CuSO_4 $9,94 \cdot 10^{-3}$ M para un volumen final de 0,96 ml y un nivel de probabilidad del 95% . Para la determinación de metformin en tabletas de Glucophage resulta ser de 0,11 ml de CuSO_4 $9,94 \cdot 10^{-3}$ M para un volumen final de 2.5 ml y el mismo nivel de probabilidad.

A la vista de la tabla, figuras mencionadas y de los resultados obtenidos en la aplicación del método de Vrestal se puede decir: que la determinación de las mencionadas biguanidas en los citados medicamentos es exacta y segura. El método es general y la determinación resulta rápida, invirtiéndose de 20 a 30 minutos en su realización. La utilización del método standard requiere más tiempo, ya que aunque no se tenga que tratar la muestra previamente a la determinación, caso en el que el tiempo invertido es muy superior, el material a utilizar ha de estar exento de agua .

	valor declarado	valor método standard	valor método propuesto
HIBITANE 5 %	5%	4,6 %	4.5 %
PROGUANIL	-	99,8 %	98.8 %
COULDINA	100 mg	-	99.1 mg
GLUCOPHAGE	850 mg	826 mg	823 mg

Tabla 47.- Determinación de biguanidas en medicamentos.

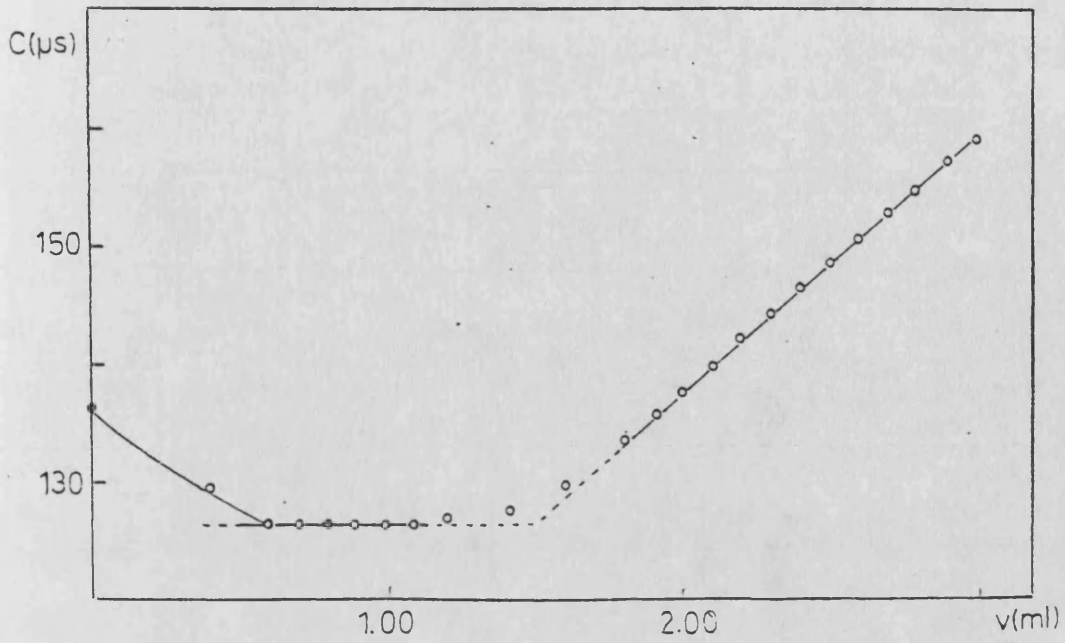


Figura 23.- Determinación conductimétrica de clorhexidina en Hibitane 5 %.

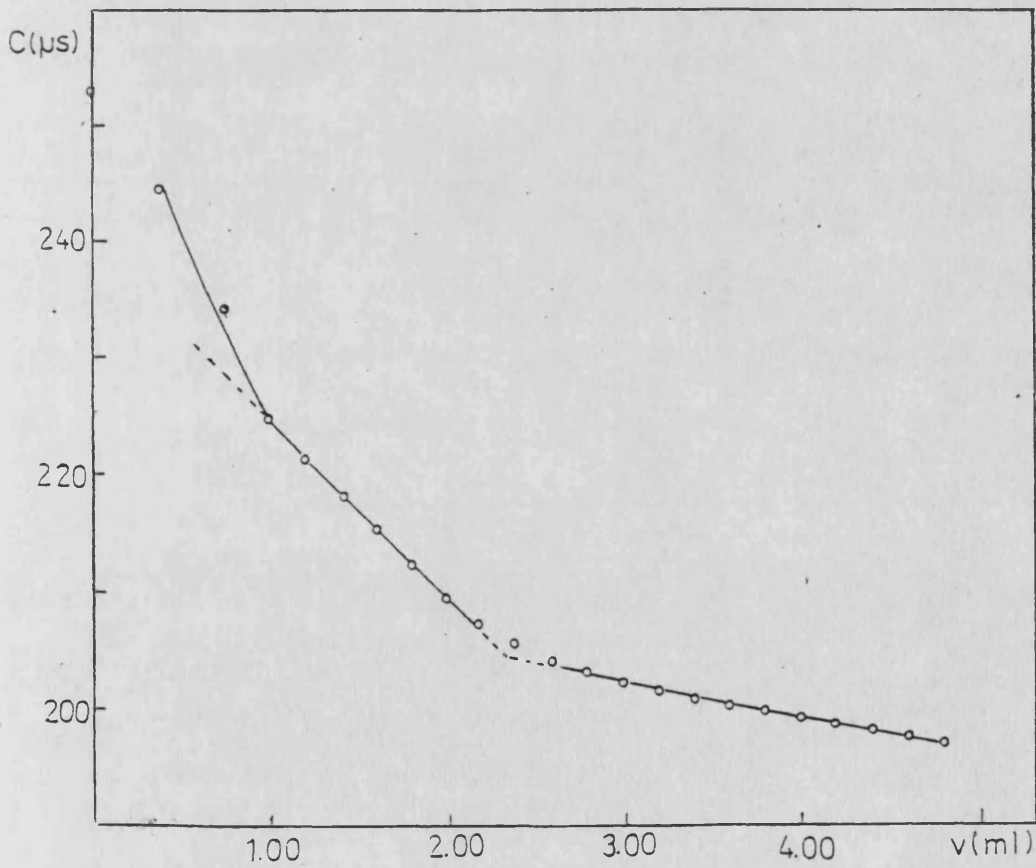


Figura 24.- Determinación conductimétrica de Proguanil.

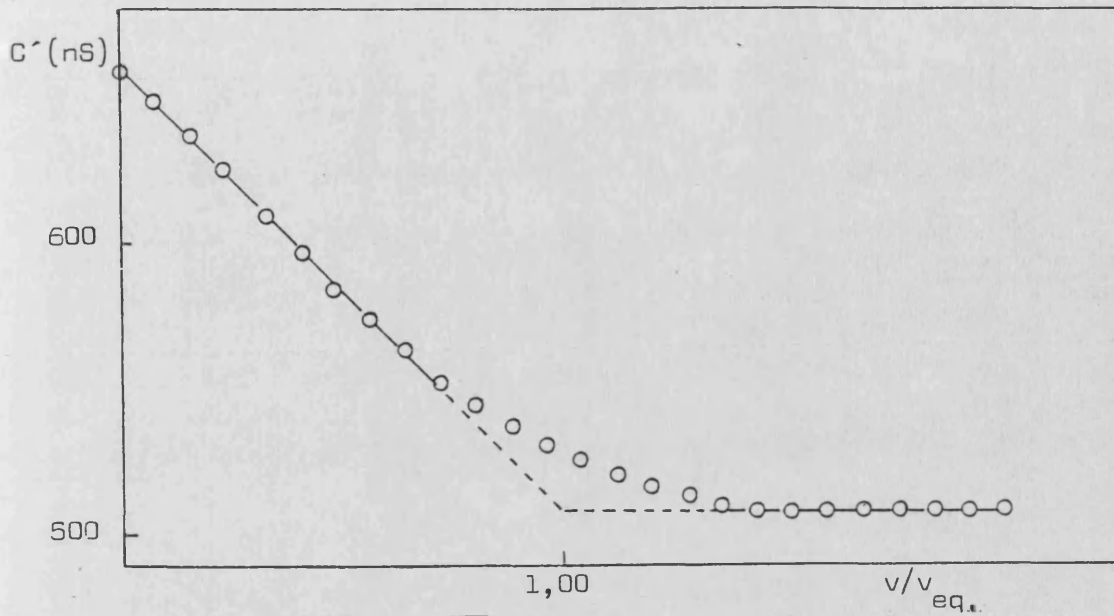


Figura 25.- Determinación conductimétrica de metformina en tabletas de Glucophage.

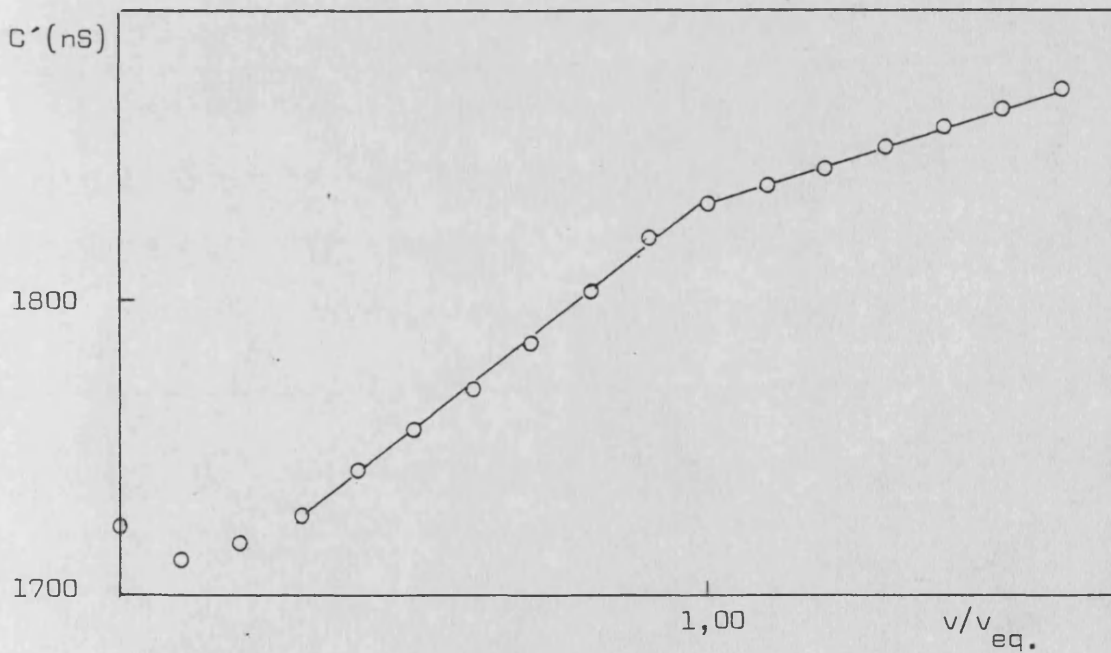


Figura 26.- Determinación conductimétrica de moroxidina en tabletas de Couldina.

II.2.4.- CONCLUSIONES

- Se determinan las constantes de acidez de la 2-sulfoetilbiguanida. La aplicación del método de los promedios a las lecturas de absorbancia a 232 nm de disoluciones a diferentes pH de biguanida, da un valor para el pK_{a2} de $3,2 \pm 0,2$. A partir del método potenciométrico se calculan pK_{a3} , pK_{a2} y pK_{a1} , siendo los valores obtenidos de 0,85, 2,97 (método de Speakman) y 11,38 (método analítico), respectivamente.
- El pK_{ps} de la agrupación Cu(II) - 2-sulfoetilbiguanida de estequiometría 1:2 (medidas espectrofotométricas y conductimétricas) calculado a partir del método de solubilidad resulta ser 20,62.
- Se aprovecha la reacción entre el Cu(II) y las biguanidas para proponer un método volumétrico de estas últimas, utilizando indicador conductimétrico de punto final. Las biguanidas estudiadas son: clorhexidina, proguanil, metformin y moroxidina; formando las dos primeras complejos sólidos y las últimas solubles.
- Se estudia la influencia del medio (pH, presencia de NH_3 y concentración de etanol para el caso de los precipitados); también se ensayan como valorante distintas sales de Cu(II). Los medios más adecuados para la valoración son:
 - A).- Complejos sólidos.- 3 ml de NH_4OH 0,2 M, 9 ml de NaOH 0,01 M diluido a 60 ml con etanol al 15 %.
 - B).- Complejos solubles.- pH entre 11,00 - 11,50 que se consigue con NaOH - NH_3 en relación 1:15.

Las sales de Cu(II) elegidas como valorantes son el $Cu(Acetato)_2$

para el caso de la clorhexidina y proguanil y el CuSO_4 para el metformin y la moroxidina.

- Se estudia la influencia de la concentración de reactivos en la forma de las curvas obtenidas para el clorhidrato de clorhexidina (rango de concentración estudiado $3,02 \cdot 10^{-5}$ - $4,26 \cdot 10^{-4}$ M) y el clorhidrato de metformin ($1,70 \cdot 10^{-4}$ - $1,70 \cdot 10^{-3}$ M). El método es aplicable en el intervalo de concentraciones de clorhexidina que va de $5,76 \cdot 10^{-5}$ - $3,40 \cdot 10^{-4}$ M con un error relativo que oscila entre 0,4 y 1,3 %, la dsr varía de 0,9 a 1,2 %. Para el caso del clorhidrato de metformin el rango de aplicación es $2,55 \cdot 10^{-4}$ - $1,70 \cdot 10^{-3}$, oscilando el error relativo entre 1,1 y 2,0 % y la dsr entre 0,8 y 1,7 %.
- El ácido ascórbico no interfiere en la determinación en un exceso de 100 veces sobre la concentración de clorhexidina (complejos sólidos), mientras que la sacarosa de 50. La benzocaína y el ácido acetilsalicílico no molestan cuando su concentración es 10 veces superior.
- El ácido ascórbico no interfiere en la determinación de metformin (complejos solubles) con Cu(II) cuando está 10 veces en defecto. La sacarosa no interfiere cuando su concentración es 100 veces superior a la biguanida, la determinación admite 15 veces de exceso de ácido acetilsalicílico. La benzocaína no molesta.
- Se procede a la determinación de biguanidas en preparados farmacéuticos : Digluconato de clorhexidina en Hİbitane 5 %

(método propuesto 4,5 %. Método standard 4,6 %); clorhidrato de proguanil (método propuesto 98,8 %. Método standard 99,8 %) ; clorhidrato de moroxidina en Couldina (método propuesto 99,1 mg) Método standard - . Declarado 100 mg); clorhidrato de metformin en Glucophage (método propuesto 823 mg. Método standard 823 mg).

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D.ª Pilar Campins Faló
la calificación de Apto "Cum Laude"

Valencia, a 27 de Junio de 1985.

El Secretario,



R 2782

II.3.-ESTUDIOS CROMATICOS SOBRE LA VALORACION
DE BIGUANIDAS EN MEDIO ACETICO GLACIAL
CON ACIDO PERCLORICO



**FACULTAD QUIMICA
BIBLIOTECA**

Cat.

Encuad.

Ent. 2782-Q

Mat. 615.07

Sell.

Test.

Top.

T. D-Q

205

Cod. IS. 80001604767.

Ri. 18690889

II.3.1.- PROGRAMA DE CALCULO

Ordenador : Calculadora programable CASIO FX-702P.

Lenguaje : Basic.

Ocupación memoria : 1270 pasos de programa, Instrucción DEFM 4.

En el presente programa, se ha utilizado la tabla 48 , en la que aparecen los valores constantes por los que se multiplican los valores de absorbancia ó transmitancia (obtenidos en el intervalo 380 a 770 nm cada 10 nm) para el cálculo de los valores triestímulus. También se utilizan las fórmulas que figuran en la tabla 3, con las que se obtienen las coordenadas cromáticas en los distintos sistemas (excepto el RUCS 1939) y el valor de la concentración óptica.

Para acceder a los resultados, se introducen consecutivamente los 40 datos de absorbancia (color complementario) ó de transmitancia (color verdadero) utilizando la instrucción EXE despues de cada dato. Al introducir el último dato (de longitud de onda 770 nm) aparece el primer resultado y aplicando la instrucción CONT apareceran sucesivamente todos los demás. Estos resultados son:

X, Y, Z (valores triestímulus); W (suma de los anteriores); X,Y,Z, (coordenadas cromáticas x,y, z en el CIE 1931); J (concentración óptica); LU (luminosidad); U,V (coordenadas u,v. Sistema CIE 1960); A,B,L (coordenadas $a^*b^*L^*$. Sistema Cie $L^*a^*b^*$ 1976).

Una forma de comprobar que el programa se ha escrito correctamente, es dar a todas las absorbancias el valor unidad (este caso corresponde al punto gris); Los resultados han de ser los siguientes:

X = 98041, Y = 100000, Z = 118103, W = 316144, X = 0.3101150109,
y = 0.3163115542, Z = 0.3735734349, J = 1, LU = 1, U = 0.2008676723,
V = 0.3073219453, A = 0, B = 0, L = 100,0036.

El listado del programa se muestra en la figura 27 .

El diagrama de flujo correspondiente al programa descrito se da en la figura 28 , siendo:

(a) 1.- Inicio; 2.- Entrada de datos: absorbancia ó transmitancia;
3.- Calculo de X,Y,Z-impresión de X,Y,Z; .4.- cálculo de J, x,y,u,v-
impresión de J,x,y,u,v; 5.- subrutina 1; 6.-subrutina 2;7.- subrutina 3;
8.- cálculo de a^* , b^* , L^* -impresión de a^* , b^* , L^* ; y 9.-fin.

(b) Subrutinas.- 1.-Inicio; 2.- subrutina 1: $2x/x_0 > 0.008856$;
3,4.- cálculo de F(1). Subrutina 2: $2y/y_0 > 0,008856$; 3,4.- cálculo
de F(2). Subrutina 3: $2z > 0,008856$; 3,4.- cálculo de F(3); y
5.- fin.

λ	$(\bar{x}h)_\lambda$	$(\bar{y}h)_\lambda$	$(\bar{z}h)_\lambda$
380	4		20
90	10		89
400	85	2	404
10	329	0	1570
20	1238	37	5949
30	2097	122	14628
40	3076	262	19038
450	3915	443	20638
60	3362	694	19299
70	2272	1058	14072
80	1112	1618	9481
90	363	2358	5274
500	52	3401	2864
10	80	4833	1620
20	570	6402	712
30	1523	7934	388
40	2785	9149	195
550	4282	9832	86
60	5890	9841	39
70	7322	9147	20
80	8417	7992	10
90	8984	6627	10
600	8949	5310	7
10	8726	4170	2
20	7070	3153	2
30	5309	2190	
40	3603	1443	
650	2340	880	
60	1301	604	
70	708	259	
80	369	134	
90	171	62	
700	82	29	
10	39	14	
20	19	6	
30	8	3	
40	4	2	
750	2	1	
60	1	1	
70	1		
Suma	98011	100000	118103
Co. V. de	0.3101	0.3163	0.3730

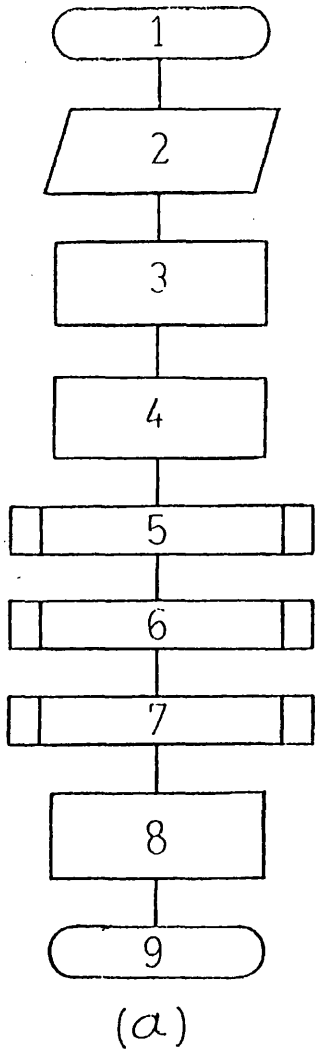
Tabla 48.- Función de distribución CIE para el iluminante C. Reproducida de M.G. Mellon "Analytical Absortion Spectroscopy" Wiley, New York, 1950, p 529.

```

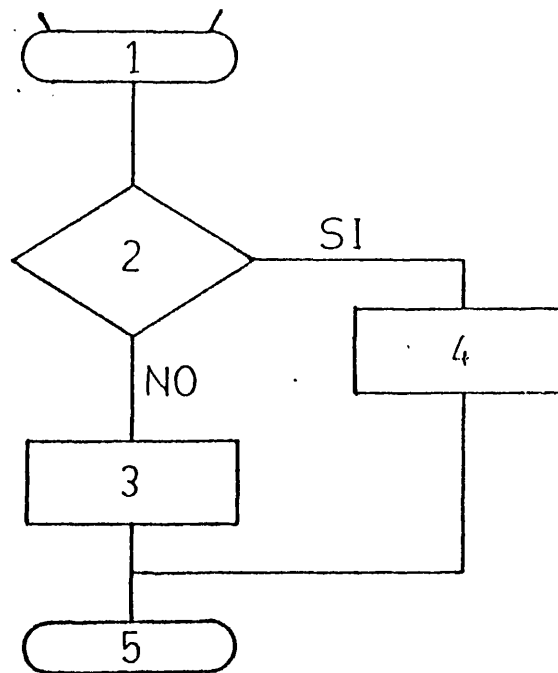
5 VAC
10 INP A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O,P,Q,R,S,T,A0,A1,A2,A3,A4
20 INP A5,A6,A7,A8,A9,B0,B1,B2,B3,B4,B5,B6,B7,B8,B9
30 C1 = A * 4 + B * 19 + C * 85 + D * 329 + E * 1238 +
      F * 2997 + G * 3975 + H * 3915 + I * 3362
40 C2 = J * 2272 + K * 1112 + L * 363 + M * 52 + N * 89
      + O * 576 + P * 1523 + Q * 2785 + R * 4282
50 C3 = S * 5880 + T * 7322 + A0 * 8417 + A1 * 8984
      + A2 * 8949 + A3 * 8325 + A4 * 7070
60 C4 = A5 * 5309 + A6 * 3693 + A7 * 2349 + A8 * 1361
      + A9 * 708 + B0 * 369 + B1 * 171
70 C5 = B2 * 82 + B3 * 39 + B4 * 19 + B5 * 8 + B6 * 4
      + B7 * 2 + B8 + B9
80 X = C1 + C2 + C3 + C4 + C5
90 PRT "X =" ; X
100 C0 = C * 2 + D * 9 + E * 37 + F * 122 + G * 262
      + H * 443 + I * 594 + J * 1058 + K * 1618
110 C6 = L * 2358 + M * 3401 + N * 4833 + O * 6462
      + P * 7934 + Q * 9149 + R * 9832 + S * 9841
120 C7 = T * 9147 + A0 * 7992 + A1 * 6627 + A2 * 5316
      + A3 * 4176 + A4 * 3153 + A5 * 2190
130 C8 = A6 * 1443 + A7 * 886 + A8 * 504 + A9 * 259
      + B0 * 134 + B1 * 62 + B2 * 29 + B3 * 14
140 C9 = B4 * 6 + B5 * 3 + B6 * 2 + B7 + B8
150 Y = C0 + C6 + C7 + C8 + C9
160 PRT "Y =" ; Y
170 D1 = A * 20 + B * 89 + C * 404 + D * 1570 + E * 5949
      + F * 14628 + G * 19938 + H * 20638
180 D2 = I * 19299 + J * 14972 + K * 9461 + L * 5274
      + M * 2864 + N * 1520 + O * 712 + P * 388
190 D3 = Q * 195 + R * 86 + S * 39 + T * 20 + A0 * 16
      + A1 * 10 + A2 * 7 + A3 * 2 + A4 * 2
200 Z = D1 + D2 + D3
210 PRT "Z =" ; Z
214 D4 = .008856:D5 = X/98041:D6 = Y/1E5:D7 = Z/118103
215 IF D5 > D4; IF D6 > D4; IF D7 > D4; GSB 500
216 IF D5 <= D4; IF D6 <= D4; IF D7 <= D4; PRT "NO"
217 U = 4 * X / (X + 15 * Y + 3 * Z) :
      V = 6 * Y / (X + 15 * Y + 3 * Z)
220 W = X + Y + Z; PRT "W =" ; W
230 X = X/W : O = Y/W : Z = Z/W : PRT "X =" ; X ,
      "Y =" ; O , "Z =" ; Z
240 J = W/316144 : PRT "J =" ; J
250 Q = Y/1E5 : PRT "LU =" ; Q
260 PRT "U =" ; U , "V =" ; V , "A =" ; A ,
      "B =" ; B , "L =" ; L
500 A = 500 * (D5↑(1/3) - D6↑(1/3)) :
      B = 200 * (D6↑(1/3) - D7↑(1/3))
501 L = 116 * (D6↑(1/3) - .1379) : RET

```

Figura 27.- Programa de cálculo para la obtención de los datos cromáticos.



(a)



(b)

Figura 28.- Diagrama de flujo.

II.3.2.- ESTUDIO CROMATICO - COMPARATIVO DE INDICADORES

La elección del indicador adecuado para una valoración ácido-base en solución acuosa es relativamente sencilla, ya que basta con conocer el pH del punto de equivalencia y el incremento de pH correspondiente al intervalo de transición de color de los diversos indicadores.

Para valoraciones en disolventes no acuosos resulta menos simple la elección del indicador idóneo dada la dificultad de adecuar rangos de pH a intervalos de viraje, éstos se suelen evaluar a partir de la valoración potenciométrica correspondiente. Sin embargo, para disolventes con baja constante dieléctrica es más difícil adecuar el viraje del indicador a los valores potenciométricos por falta de reproducibilidad, ya que habrá una deficiencia de ionización en beneficio de una mayor formación de pares iónicos.

Las determinaciones volumétricas en medio no acuoso son de considerable importancia en análisis de muestras farmacéuticas y han sido adoptadas como métodos standards en las farmacopeas. El punto final de la valoración se determina potenciométricamente ó bien mediante un indicador visual de punto final, procedimiento éste mucho más rápido.

En la bibliografía se proponen varios indicadores para la valoración de bases débiles en medio acético glacial, pero no existe un criterio objetivo de evaluación de la calidad de los mismos. Por esta razón, en esta memoria se realiza dicha evaluación en base a "Complementary Tristimulus Colorimetry". Para ello, se establece la transición cromática de cada indicador y se representa en los

diagramas de color; de la longitud y posición de cada una de estas curvas se obtienen unas primeras conclusiones, que luego se confirman y amplían a partir de los diagramas $\Delta J/\Delta v$ y $\Delta E^*/\Delta v$. Dichos diagramas, muestran la concordancia entre la transición del indicador y el punto de equivalencia, es decir, dan la exactitud. También, muestran la nitidez del viraje del indicador al indicar la magnitud de la variación de color en el punto final.

Se ha realizado el estudio sobre 5 indicadores, de los cuales dos (violeta cristal y violeta de metilo) presentan tres estadios de color, otros dos (O.O Tropaolin y verde de malaquita) dos cambios de color y, el último, purpura de bromocresol, marca el punto final por desaparición de color.

El estudio se ha realizado con el compuesto perteneciente al grupo de las biguanidas, denominado "metformin". Esta sustancia posee en su estructura 3 grupos aminos; en la valoración de éste en medio acético glacial tan solo se valoran los grupos amino 1ª y 2ª, por ser el 3ª demasiado débil. Este compuesto presenta una solubilidad adecuada para su valoración directa.

Procedimiento

A 5 ml de disolución de metformin conteniendo 38.4 mg, se añaden 5 ml de disolución de $HgCl_2$ 5 % y el indicador correspondiente. Las cantidades de indicador que se añaden se especifican más adelante, eligiéndose de modo que la absorbancia en la disolución final se halle en el intervalo comprendido entre 0,1 y 0,3 para la longitud de onda del máximo de absorción. Por último se diluye con ácido acético glacial hasta un volumen de 50 ml aproximadamente.

Las medidas espectrofotométricas correspondientes se realizan haciendo uso de una celda de flujo y de una bomba peristáltica.

El valorante utilizado es HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M; la adición de éste se realiza por medio de una bureta de 10 ml, y las cantidades añadidas oscilan entre 0,5 y 1.0, excepto en la zona cercana al punto final donde son de 0,1 ml. Se añaden en total alrededor de 7 ml de valorante.

La disolución permanece constantemente agitada. Después de cada adición de valorante, se bombea a través de la celda de flujo durante un período de 2 minutos, suficientes para homogeneizar la disolución en todo el sistema. Se registran los valores de absorbancia ó de transmitancia de la disolución cada 10 nm en el intervalo de 770-380 nm una vez detenida la bomba peristáltica.

Con los valores experimentales obtenidos y utilizando el programa de cálculo expuesto en la parte anterior, se determinan para cada punto de la valoración los valores triestímulus, que correspondan al color verdadero en el caso de emplear las lecturas de transmitancia y el color complementario si se emplean las lecturas de absorbancia, así como las coordenadas cromáticas en los sistemas CIE 1931, CIE 1960, CIE 1976 y que permiten establecer la transición de color de cada indicador.

Todos los indicadores utilizados se preparan en la disolución acética. Las cantidades de indicador que se han empleado son:

- 0,05 ml de violeta cristal 0,1 %
- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %
- 0,1 ml de verde de malaquita 0,1 %
- 0,1 ml de O.O Tropaeolin 0,1 %
- 0,2 ml de púrpura de bromocresol 0,1 %

Resultados

En las tablas 49 a 53 aparecen los valores triestímulus obtenidos en la valoración espectrofotométrica de los indicadores estudiados. Las transiciones cromáticas se calculan en distintos sistemas y se hallan representadas en las figuras 29 a 31 .

Las tres representaciones permiten obtener el mismo tipo de conclusiones, sin embargo, hay que decir que el diagrama CIA L*a*b*1976 resulta ventajoso frente al CIE 1931 y CIE 1960, ya que presenta un espaciado cromático más uniforme.

En la valoración espectrofotométrica de metformin con HClO_4 utilizando violeta de metilo como indicador visual, se observan los siguientes cambios de color, violeta-azul-verde-amarillo, al igual que ocurre cuando se utiliza violeta cristal como indicador. El punto gris queda alejado de estas transiciones; éstas, son curvilíneas y largas. La separación cromática (distancia entre las coordenadas cromáticas de puntos consecutivos en el diagrama de cromaticidad) es grande en las proximidades del punto final potenciométrico, lo que indica que el punto final coincidirá con aquel. Ambos indicadores tienen comportamientos similares.

El verde de malaquita presenta una transición que va del verde al amarillo, ésta queda alejada del punto gris, es recta y bastante corta, sin embargo, la separación cromática es grande después del punto final potenciométrico, lo que indica un viraje posterior a dicho punto.

El púrpura de bromocresol presenta transición de amarillo a incoloro, luego ésta pasa por el punto gris, ya que el blanco es un extremo en la escala de los grises; dicha escala está constituida

por componentes de iguales coordenadas a^* , b^* y diferente coordenada L^* ó luminosidad. Para el caso del incoloro L^* vale 100 hablando en términos del sistema CIE $L^*a^*b^*$ 1976. La transición es corta y recta. La separación cromática es relativamente pequeña en toda la recta, siendo máxima antes del punto final potenciométrico, lo que indica un viraje anterior a dicho punto.

El 0.0 Tropaeolin presenta una transición que va del amarillo al rojo, la longitud de la curva es mayor que la que presentan el púrpura de bromocresol y el verde de malaquita, e inferior a las correspondientes a los otros dos restantes indicadores. La separación cromática en las proximidades del punto final potenciométrico es similar a la que presenta el púrpura de bromocresol.

De lo expuesto anteriormente y de la observación de las figuras 29 a 31 se puede decir que los indicadores que presentan mayor longitud en la transición y mayor separación cromática en las proximidades del punto final potenciométrico son: violeta cristal y violeta de metilo, por ello son los más adecuados para realizar las valoraciones de biguanidas con HClO_4 seguidas visualmente. El punto final lo marca la transición azul-verde.

En las tablas 54 a 58 se exponen los valores de la concentración óptica, así como la variación de este parámetro relacionado con el incremento de volumen (ml) para cada uno de los indicadores estudiados. Estos datos se representan gráficamente y de manera conjunta para todos los indicadores, lo que facilita el estudio comparado (figura 32).

La nitidez del viraje se deduce observando el valor de las ordenadas en las cercanías del punto final; podemos observar a la vista de la figura 32 , que presentan gran nitidez el violeta

crystal y el violeta de metilo. El verde de malaquita y el 0.0 Tro-paolin presentan intensidades de pico semejantes e inferiores a las que presentan el violeta de cristal y el violeta de metilo, la menor nitidez corresponde al púrpura de bromocresol.

En cuanto a la exactitud, hay que decir, que los errores de estos indicadores son similares y en todos los casos inferiores al 2% (valores máximos de ordenada entre 4,90 - 5,10 ml de HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M). En el caso del violeta de metilo y el violeta cristal los puntos finales coinciden con el punto final potenciométrico; el punto de inflexión de la curva $E(\text{mV}) = f(v(\text{ml}))$ corresponde a 5,02 ml de HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M.

Por su propia definición matemática, la concentración óptica puede conducir a error en aquellos casos en que la variación de los tres valores triestímulus no se produzca en el mismo sentido. Para subsanar este problema se utiliza también la diferencia de color ΔE^* . En las tablas 59 a 63 se da su valor y su variación respecto al incremento de volumen (ml). En la figura 33 se ha representado su variación en función del volumen de valorante (ml).

Las conclusiones que se derivan de esta figura son semejantes a las derivadas de la figura 32, sin embargo, cabe señalar la mayor altura en los picos que corresponden al 0.0 Tro-paolin y verde de malaquita, hecho que se puede interpretar teniendo presente que en el cálculo de ΔE^* interviene el término L^* de luminosidad. También hay que decir que en el caso del verde de malaquita se produce el efecto señalado en el párrafo anterior.

v(ml) HClO ₄ 9,21 10 ⁻² M	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	77566,9	74921,9	116669,7	10912,7	13176,9	651,6
3,00	73588,1	76194,8	115477,9	10201,7	12324,4	734,5
4,00	79466,9	76934,4	116539,3	9858,2	11827,7	705,1
4,50	79234,4	77714,5	116461,0	9706,5	11377,2	736,5
4,70	79466,9	78573,3	116303,5	9432,4	10900,5	802,8
4,80	79862,9	79615,6	116106,3	9207,3	10230,2	837,1
4,90	80824,2	81823,8	115931,7	8572,9	8963,9	960,2
4,95	81960,0	84557,8	115319,4	7892,1	7484,5	1229,5
5,00	84299,9	88655,0	113970,2	6564,1	5338,8	1833,7
5,05	88401,1	93315,7	111146,7	4471,7	3059,1	3123,9
5,10	90775,5	95330,5	109496,5	3311,9	2103,4	3893,0
5,20	92666,3	96733,7	108041,4	2424,5	1454,4	4581,7
5,50	94428,2	97971,2	106817,9	1583,1	864,7	5167,3
6,00	95171,2	98425,6	106152,2	1303,7	698,5	5489,2

Tabla 49.- Valores triestímulus de la transición de color del violeta cristal.

v(ml) HClO ₄ 9,21 10 ⁻² M	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	79615,4	77588,7	116361,1	9518,8	11463,5	780,2
1,00	79948,9	78008,3	116461,9	9307,1	11201,2	735,6
2,00	80262,5	78351,2	116458,9	9105,1	10981,1	736,9
3,00	80562,7	78771,2	116452,7	8911,5	10724,1	738,9
3,50	80562,7	79029,3	116374,2	8816,5	10566,9	772,8
4,00	80698,7	79367,4	116341,2	8720,1	10363,4	786,2
4,50	81096,6	80161,3	116210,7	8509,1	9889,9	841,3
4,70	81375,9	81054,2	115942,6	8239,9	9359,9	957,2
4,80	81730,5	82026,8	115842,8	8043,8	8810,5	999,5
4,90	82453,1	83947,8	115504,4	7580,1	7750,9	1146,9
5,00	84624,1	88234,9	114430,2	6380,8	5529,9	1625,1
5,10	98560,2	93151,8	111791,7	4384,8	3128,2	2825,3
5,20	91309,2	95539,8	109644,9	3051,2	1999,7	3822,6
5,30	92363,5	96271,8	108597,2	2556,9	1660,1	4316,1
5,50	93490,4	97076,4	107556,7	2043,6	1295,0	4811,3
5,70	94400,2	97693,4	106930,1	1822,9	1155,7	5112,1
6,00	94337,8	97579,1	106379,8	1669,4	1071,2	5377,8
7,00	94872,5	97891,6	105840,0	1436,8	934,3	5639,3

Tabla 50.- Valores triestímulus de la transición de color del violeta de metilo.

v(ml) HClO ₄ 9,21 10 ⁻² M	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	93395,3	98859,7	93568,6	2319,8	529,9	12217,9
1,00	93507,0	98878,8	94277,5	2252,2	519,6	11810,8
2,00	93829,3	98993,1	95777,9	2074,0	465,6	10963,0
3,00	94705,1	99248,0	100171,3	1601,4	344,1	8577,9
3,50	95267,4	99334,9	103325,9	1306,5	278,6	6944,5
4,00	95923,8	99565,0	106868,7	977,2	195,3	5176,9
4,50	96816,9	99785,3	111573,9	550,8	95,3	2934,3
4,80	97502,1	99926,1	115266,1	237,8	32,4	1251,2
4,90	97789,4	99975,0	116803,2	110,2	10,9	568,9
5,00	98038,9	99999,9	118093,4	0,0	0,0	0,0
5,10	-	-	-	0,0	0,0	0,0

Tabla 51.- Valores triestímulus de la transición
de color del púrpura de bromocresol.

v(ml) HClO ₄ 9,21 10 ⁻² M	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	80385,7	88168,9	114187,5	8995,0	5869,8	1759,2
1,00	80724,9	88357,2	114398,3	8788,4	5758,6	1661,7
2,00	81084,0	88573,1	114617,1	8574,0	5634,6	1561,8
3,00	81401,2	88775,7	114751,1	8388,7	5520,5	1500,4
3,50	81493,5	88865,3	114803,9	8334,0	5474,0	1477,3
4,00	81686,8	88995,9	114891,4	8224,1	5402,1	1436,7
4,50	81957,0	89213,5	114925,6	8074,0	5291,7	1444,9
4,70	82152,1	89376,1	114849,4	7958,1	5197,9	1454,9
4,80	82400,9	89575,7	114820,3	7814,2	5090,5	1468,6
4,90	82883,6	89960,7	114597,9	7533,6	4882,2	1567,5
5,00	84192,7	90907,0	113588,6	6778,4	4364,0	2018,2
5,10	87907,8	93455,4	110554,2	4749,5	3025,5	3400,2
5,20	91269,3	95727,9	108226,4	3083,4	1922,5	4489,3
5,30	92905,4	96817,7	107211,3	2318,8	1418,7	4973,1
5,40	93597,2	97287,9	106590,3	2003,9	1206,4	5271,4
5,50	94208,6	97668,9	106215,2	1730,0	1036,2	5452,5
6,00	95303,2	98374,6	105421,7	1249,9	726,8	5838,0
7,00	95708,3	98603,7	105083,7	1075,9	627,6	6003,5

Tabla 52.- Valores triestímulus de la transición de color del verde de malaquita.

v(ml) HClO ₄ 9,21 10 ⁻² M	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	95968,2	99492,8	106909,9	974,6	240,5	5149,1
1,00	95993,4	99508,4	107055,1	994,4	220,1	5078,8
2,00	96017,7	99464,5	107186,1	931,9	239,2	5013,2
3,00	95744,8	93670,9	107218,8	1049,1	586,9	4989,9
3,50	95339,8	97689,5	107479,6	1223,7	1021,6	4856,8
4,00	94463,7	95823,3	107741,4	1604,1	1860,4	4720,8
4,20	93942,6	94660,7	108049,2	1845,8	2403,7	4571,2
4,40	93145,6	93008,5	108333,1	2211,4	3173,4	4431,4
4,50	92573,8	91743,1	108624,6	2480,0	3779,4	4292,5
4,60	91880,8	90333,9	108849,5	2809,8	4465,7	4188,1
4,70	91099,4	88724,5	109237,8	3189,8	5266,4	4010,2
4,80	90248,9	86939,1	109570,0	3614,8	6177,7	3863,7
4,90	89171,2	84712,5	110152,2	4685,6	8359,7	3629,8
5,00	88178,3	82836,6	110152,2	4685,6	8359,7	3629,8
5,10	87809,4	82101,6	109723,7	4881,9	8769,4	3335,8
5,20	87624,4	81919,6	109085,5	4971,9	8868,9	4132,9
5,30	87462,4	81774,4	108375,9	5050,4	8949,0	4464,7
5,50	87235,8	81585,2	107257,1	5159,6	9054,5	4992,4
6,00	86964,9	81417,3	105906,3	5288,6	9144,9	5638,3
7,00	86902,1	81491,4	104246,7	5315,8	9109,9	6441,8

Tabla 53.- Valores triestímulus de la transición de color del 0.0 tropaolin.



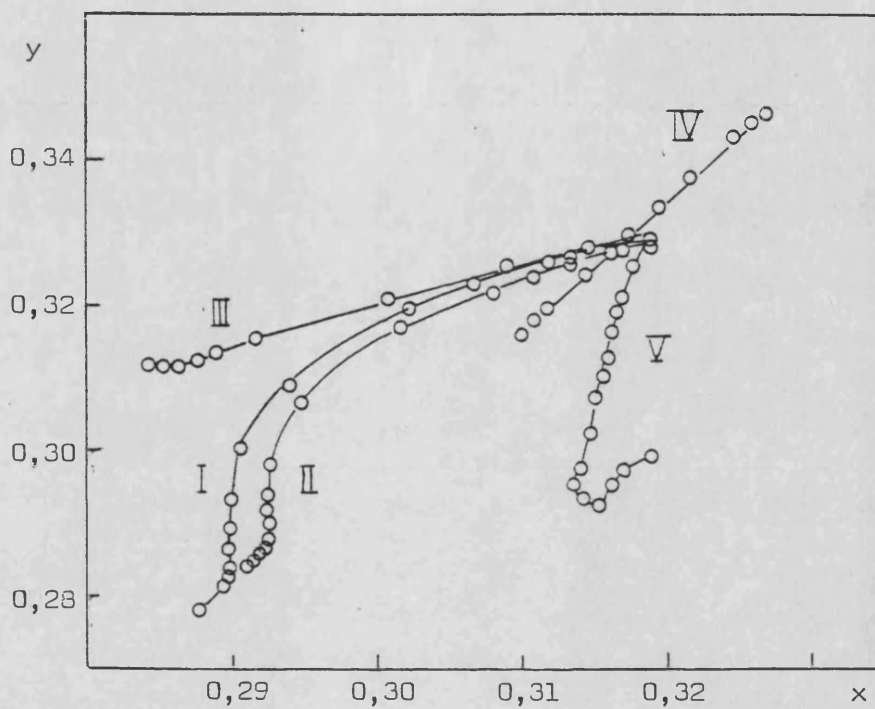


Figura 29.- Curvas de transición de color de los indicadores. Sistema CIE 1931.

I.- violeta cristal, II.- violeta de metilo,
III.- verde de malaquita, IV.- púrpura de bromocresol y V.- O.O Tropaolin.

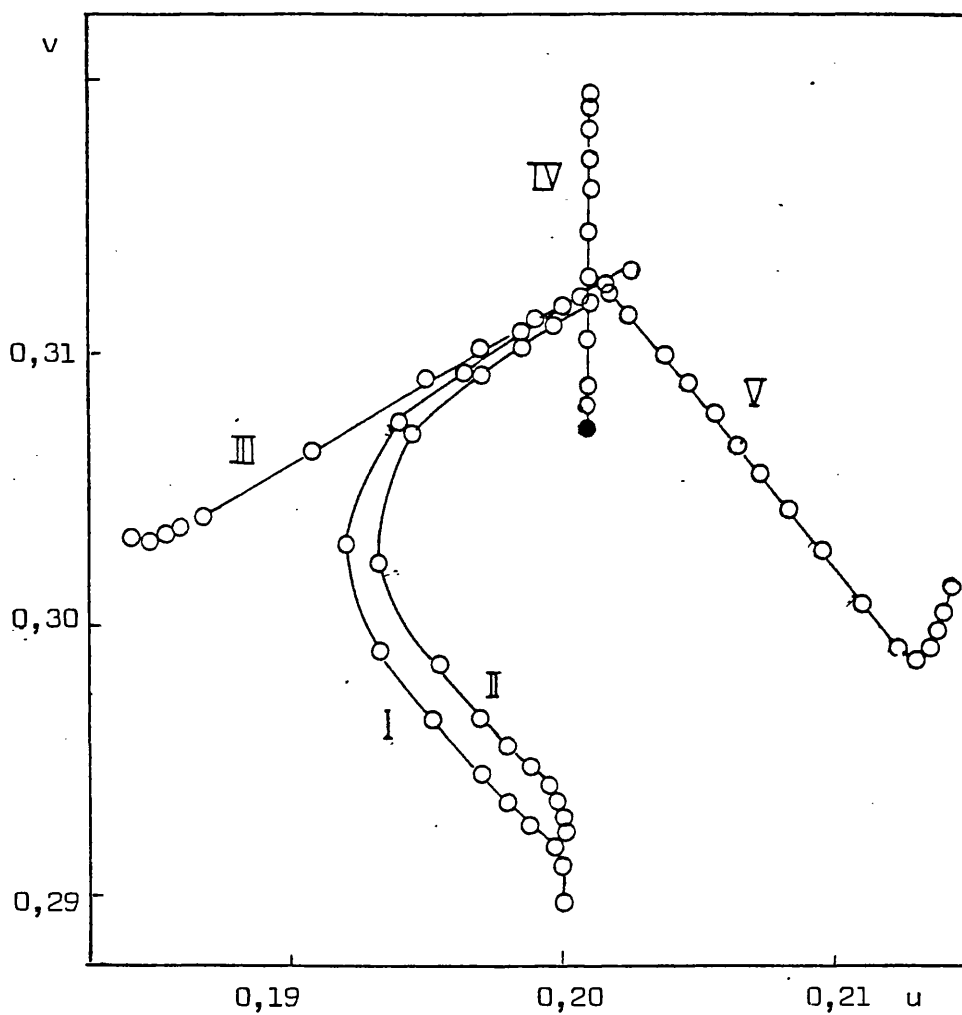


Figura 30.- Curvas de transición de los indicadores.
Sistema CIE 1960.

I.- violeta cristal, II.- violeta de metilo,
III.- verde de malaquita, IV.- púrpura de bro-
mocresol y V.- O.O tropaolin.

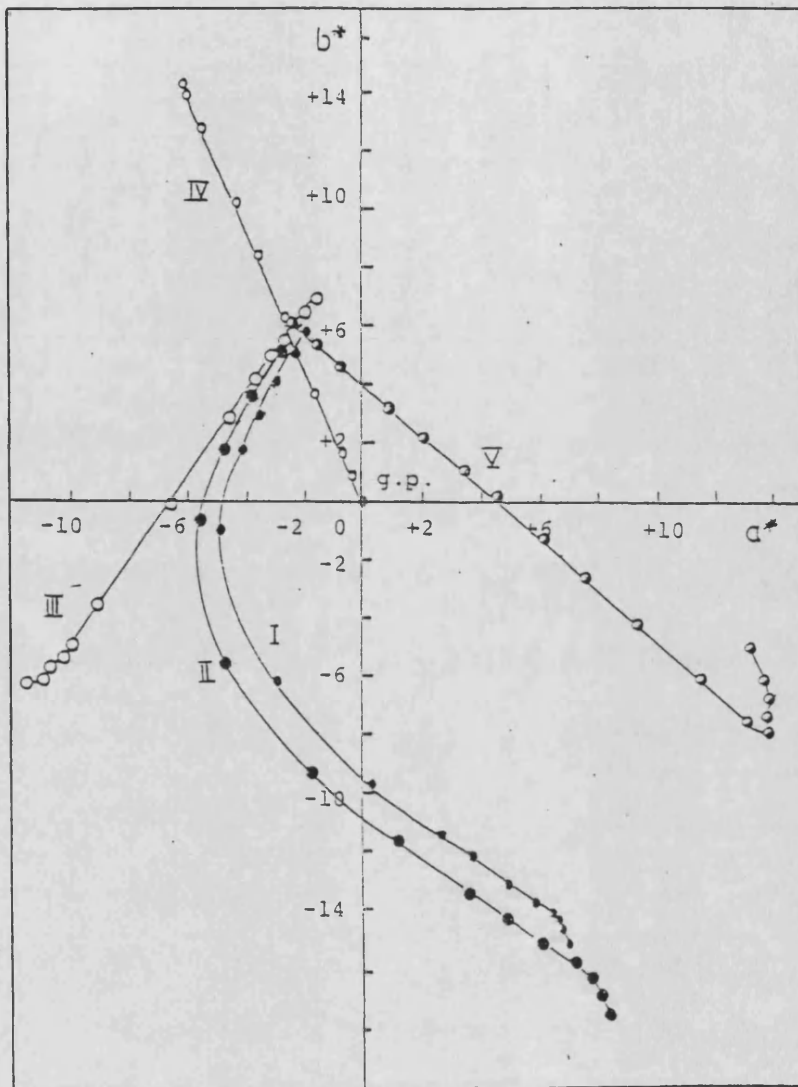


Figura 31.- Curvas de transición de color de los indicadores. Sistema CIE $L^*a^*b^*$ 1976.

I.- violeta de metilo, II.- violeta cristal, III.- verde de malaquita, IV.- púrpura de bromocresol y V.- 0.0 Tropaeolin.

$v(\text{ml})_v$	J	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,07826	-1,40	1,00
2,00	0,07545	-1,87	2,50
3,00	0,07358	-2,75	3,50
4,00	0,07083	-3,62	4,25
4,50	0,06902	-12,0	4,60
4,70	0,06654	-22,5	4,75
4,80	0,06429	-57,8	4,85
4,90	0,05851	-119,6	4,93
4,95	0,05253	-181,6	4,98
5,00	0,04345	-195,0	5,03
5,05	0,03370	-85,2	5,08
5,10	0,02944	-26,8	5,15
5,20	0,02676	-8,90	5,35
5,50	0,02409	-0,78	5,75
6,00	0,02370		

Tabla 54.- Variación de la concentración óptica para el violeta cristal.



$v(\text{ml})_v$	J	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,04766	-1,50	0,50
1,00	0,04613	-3,42	1,50
2,00	0,04271	-9,42	2,50
3,00	0,03329	-12,62	3,25
3,50	0,02698	-13,80	3,75
4,00	0,02008	-17,50	4,25
4,50	0,01133	-21,70	4,65
4,80	0,004812	-26,30	4,85
4,90	0,002183	-21,80	4,95
5,00	0,0		

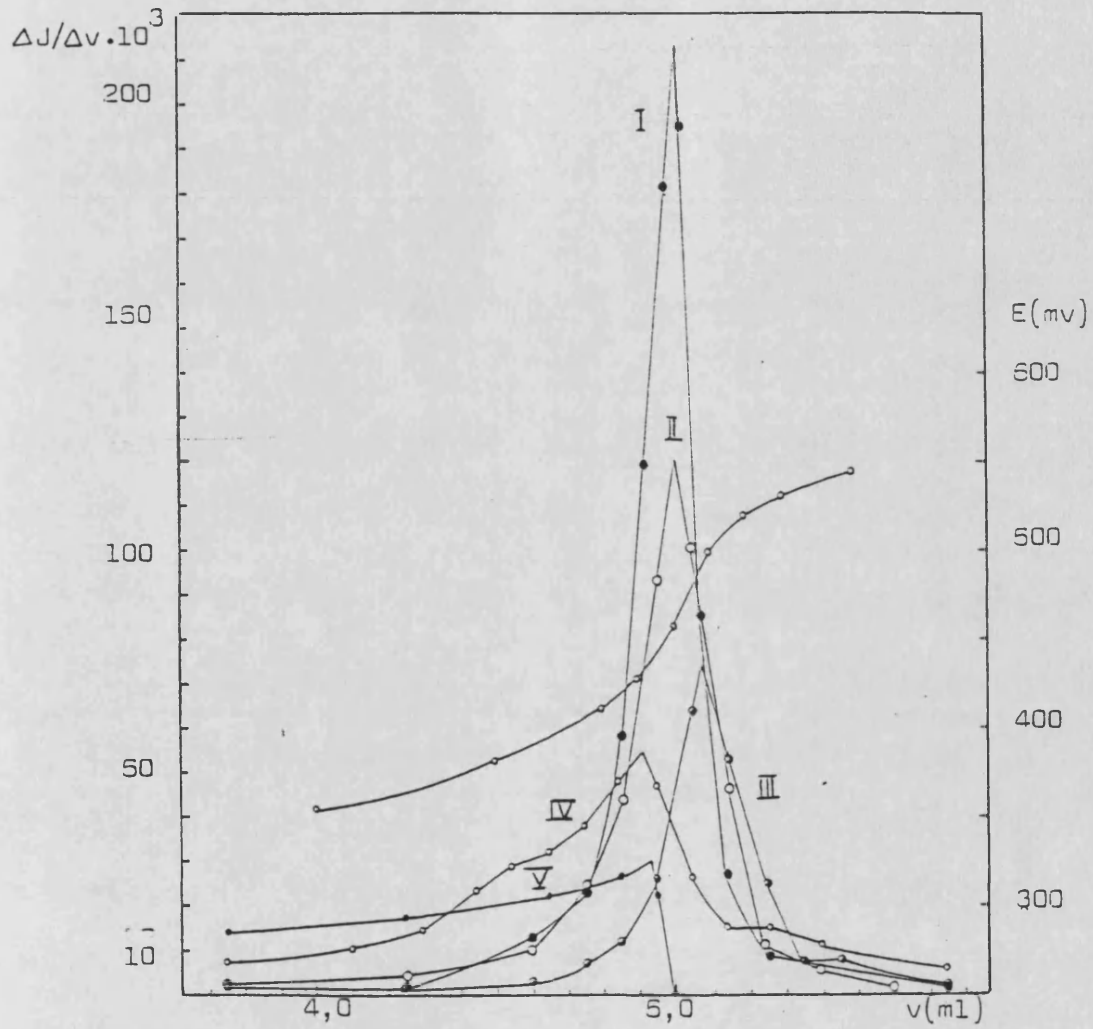
Tabla 56.- Variación de la concentración óptica para el púrpura de bromocresol.

$v(\text{ml})_v$	J	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,05258	-1,31	0,50
1,00	0,05127	-1,39	1,50
2,00	0,04988	-1,14	2,50
3,00	0,04874	-0,78	3,25
3,50	0,04835	-1,40	3,75
4,00	0,04765	-1,60	4,25
4,50	0,04685	-3,15	4,60
4,70	0,04622	-7,50	4,75
4,80	0,04547	-12,40	4,85
4,90	0,04423	-26,00	4,95
5,00	0,04163	-62,80	5,05
5,10	0,03535	-53,30	5,15
5,20	0,03003	-24,80	5,25
5,30	0,02755	-7,20	5,35
5,40	0,02683	-8,30	5,45
5,50	0,02600	-2,56	5,75
6,00	0,02472	-0,34	6,50
7,00	0,02438		

Tabla 57.- Variación de la concentración óptica
para el verde de malaquita.

$v(\text{ml})_v$	J	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,02013	-0,38	0,50
1,00	0,01975	-0,19	1,50
2,00	0,01956	1,40	2,50
3,00	0,02096	3,02	3,25
3,50	0,02247	6,84	3,75
4,00	0,02589	10,05	4,10
4,20	0,02790	15,75	4,30
4,40	0,03105	23,30	4,45
4,50	0,03338	28,80	4,55
4,60	0,03626	31,70	4,65
4,70	0,03943	37,70	4,75
4,80	0,04320	48,50	4,85
4,90	0,04805	47,00	4,95
5,00	0,05275	25,60	5,05
5,10	0,05531	15,40	5,15
5,20	0,05685	15,50	5,25
5,30	0,05840	11,75	5,40
5,50	0,06075	5,48	5,75
6,00	0,06349	2,52	6,50
7,00	0,06601		

Tabla 58.- Variación de la concentración óptica para el 0.0 Tropaolin.



I.- violeta cristal; II.- violeta de metilo;
III.- verde de malaquita; IV.- O.O Tropaolin;
V.- púrpura de bromocresol.

Figura 32.- Variación de la concentración óptica.

$v(\text{ml})_v$	ΔE^*	$\Delta E^* / \Delta v$	\bar{v}
3,00	0,9388	0,9	3,50
4,00	1,3305	2,7	4,25
4,50	1,4975	7,5	4,60
4,70	1,6380	16,4	4,75
4,80	3,1408	31,4	4,85
4,90	4,0086	80,2	4,93
4,95	5,1712	103,4	4,98
5,00	5,3632	107,3	5,03
5,05	2,6293	52,6	5,08
5,10	2,1411	21,4	5,15
5,20	1,9171	6,4	5,35
5,50	0,8983	1,8	5,75
6,00			

Tabla 59.- Variación de la diferencia de color
para el violeta cristal.

$v(\text{ml})$ v.	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,3713	0,3	0,50
1,00	0,3167	0,3	1,50
2,00	0,4501	0,5	2,50
3,00	0,3667	0,7	3,25
3,50	0,5266	1,1	3,75
4,00	1,2751	2,6	4,25
4,50	1,5161	7,6	4,60
4,70	1,4679	14,7	4,75
4,80	2,9061	29,1	4,85
4,90	5,6503	56,5	4,95
5,00	5,6225	56,2	5,05
5,10	3,1787	31,8	5,15
5,20	1,3211	13,2	5,25
5,30	1,3577	6,8	5,40
5,50	1,0001	5,0	5,60
5,70	0,2655	0,9	5,85
6,00	0,6826	0,7	6,50
7,00			

Tabla 60.- Variación de la diferencia de color para el violeta de metilo.

$v(\text{ml})$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,4811	0,5	0,50
1,00	0,9739	1,0	1,50
2,00	2,8617	2,9	2,50
3,00	2,0250	4,1	3,25
3,50	2,2035	4,4	3,75
4,00	2,8979	5,8	4,25
4,50	2,2470	7,5	4,65
4,80	0,9395	9,4	4,85
4,90	0,8189	8,2	4,95
5,00			

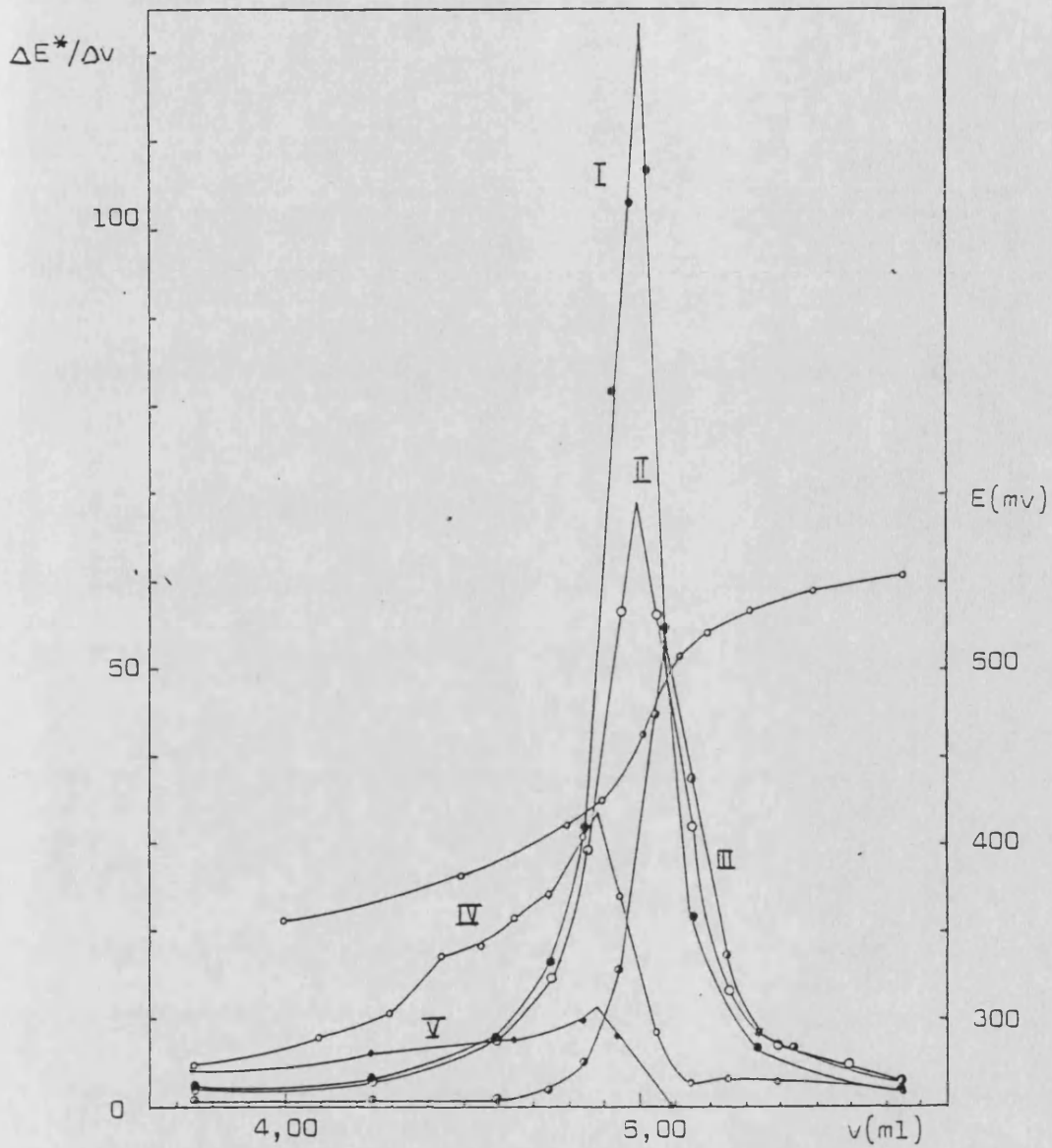
Tabla 61.- Variación de la diferencia de color
para el púrpura de bromocresol.

$v(\text{ml})_v$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,3282	0,3	0,50
1,00	0,3176	0,3	1,50
2,00	0,2717	0,3	2,50
3,00	0,0510	0,1	3,25
3,50	0,1568	0,3	3,75
4,00	0,1985	0,4	4,25
4,50	0,1965	1,0	4,60
4,70	0,2100	2,1	4,75
4,80	0,4966	5,0	4,85
4,90	1,5400	15,4	4,95
5,00	4,4230	44,2	5,05
5,10	3,7642	37,6	5,15
5,20	1,7517	17,5	5,25
5,30	0,8382	8,4	5,35
5,40	0,6552	6,6	5,45
5,50	1,2300	2,5	5,75
6,00	0,4835	0,5	6,50
7,00			

Tabla 62.- Variación de la diferencia de color para el verde de malaquita.

$v(\text{ml})_v$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,0806	0,1	0,50
1,00	0,1565	0,2	1,50
2,00	1,0721	1,1	2,50
3,00	1,3214	2,6	3,25
3,50	2,2960	4,6	3,75
4,00	1,5527	7,8	4,10
4,20	2,0830	10,4	4,30
4,40	1,6978	17,0	4,45
4,50	1,8025	18,0	4,55
4,60	2,1455	21,5	4,65
4,70	2,4023	24,0	4,75
4,80	3,0390	30,4	4,85
4,90	2,4155	24,2	4,95
5,00	0,8469	8,5	5,05
5,10	0,2530	2,5	5,15
5,20	0,3164	3,2	5,25
5,30	0,5383	2,7	5,40
5,50	0,7176	1,4	5,75
6,00	1,1015	1,1	6,50
7,00			

Tabla 63.- Variación de la diferencia de color
para el 0.0 Tropaolin.



I.- violeta cristal; II.- violeta de metilo;
III.- verde de malaquita; IV.- O.O Tropaeolin;
V.- púrpura de bromocresol.

Figura 33.- Variación de la diferencia de color.

II.3.3.- PREPARACION DE INDICADORES MIXTOS

La finalidad de este apartado es la preparación de indicadores cuyo viraje coincida con el punto gris, mejorando de este modo la comodidad y nitidez de la valoración, lo que puede favorecer la exactitud y precisión.

Para ello se obtienen indicadores mixtos, entendiendo por tal la mezcla de un indicador y uno ó varios colorantes inertes en las condiciones de trabajo. Dicha mezcla debe proporcionar un viraje del tipo: color A-gris-color B, tal como se explica en la introducción de esta memoria.

Bien utilizando la curva de transición de color del indicador elegido ó bien realizando las medidas espectrofotométricas en condiciones más adecuadas, y representando en el diagrama cromático la transición de color, se seleccionan el ó los colorantes que permitirán obtener un indicador mixto, teniendo en cuenta sus coordenadas cromáticas.

A partir de las coordenadas cromáticas del indicador en el punto final y las del colorante, y por aplicación de las fórmulas de REILLEY y SMITH (185) se deduce la cantidad de colorante necesaria para que el punto final coincida con el punto gris. Las fórmulas son las siguientes:

$$(x_I - x_G)(J'_I) + (x_C - x_G)(J'_C) = 0$$

$$(y_I - y_G)(J'_I) + (y_C - y_G)(J'_C) = 0$$

donde: I es el indicador, C el colorante y G representa el punto gris. J' es la concentración óptica.

Con la cantidad fijada por la fórmula se realizan las medidas espectrofotométricas y se representa graficamente la nueva transición cromática. Si ésta no pasa por el punto gris, se varían de modo empírico las cantidades de colorante inerte hasta que dicha transición cromática transcurra sobre el punto gris.

Por último se procede a establecer la aplicabilidad real del indicador mixto propuesto, por comparación con el indicador simple, estableciendo para ambos la mínima cantidad de metformin determinable, así como la precisión y exactitud en una serie de valoraciones visuales.

En base a las conclusiones obtenidas en el apartado anterior se eligen como más idóneos para la consecución de sendos indicadores mixtos: el violeta cristal y el violeta de metilo.

II.3.3.1.- VIOLETA DE METILO - AMARILLO DE NEOZAPON - AZUL DE TIMOL

Procedimiento

A 5 ml de disolución de metformina conteniendo 38,4 mg, se añaden 5 ml de disolución de HgCl_2 5 % y el indicador y colorantes inertes correspondientes, diluyéndose a unos 50 ml con ácido acético glacial y valorando con disolución acética de HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M. Después de cada adición de valorante se obtienen los valores de % T ó A en el intervalo de 380-770 nm cada 10 nm, bombeando la disolución a través de la celda del espectrofotómetro.

Los valores triestímulus X, Y, Z se calculan a partir de los datos espectrofotométricos y la tabla de distribución energética del iluminante standard C. A partir de los valores triestímulus se calculan las transiciones cromáticas en CIE 1960 y CIE $L^*a^*b^*$ 1976 y los valores de la concentración óptica J y los de la dife-

rencia de color ΔE^* .

Se realizan series de valoraciones visuales para comparar las características del indicador mixto propuesto y el indicador base. Para ello a 50 ml de una disolución acética que contiene entre 38,4 y 0,8 mg de metformina se adicionan 4 gotas del indicador base ó 10 gotas del indicador mixto y valorando con HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M.

Resultados

En las tablas 50 , 55 , 60 se muestran los valores triestímulus, la variación del parámetro J y la variación de ΔE^* correspondiente a la valoración con violeta de metilo.

La transición cromática (curva I) aparece en las figuras 34 y 35 , se observa que la transición transcurre lejos del punto gris, será necesaria la utilización de un colorante inerte que translade la transición hacia arriba en el diagrama cromático, es decir, que proporcione una componente amarilla. El colorante elegido es el amarillo de Neozapon ya que resulta inerte en las condiciones de trabajo .

Según los valores obtenidos por la aplicación de las ecuaciones de Reilley y Smith, que dan una cantidad de amarillo de neozapon 0,1 % de 0,16 ml para 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 % y un volumen final de 50 ml, se realizan nuevas medidas espectrofotométricas con las cantidades citadas de colorante e indicador. Los resultados obtenidos figuran en las tablas 64 , 65 , 66 . La curva II que aparece en las figuras 34 y 35 , representa la transición de color en estas condiciones y se observa que la transición aún no pasa por el punto gris.

Es necesario acercar aún más la transición cromática a las coordenadas del punto gris, por lo que se aumenta la cantidad de amarillo de neozapon, pero además se observa que este colorante desplaza la transición hacia arriba y hacia la izquierda, lo que significa que el punto gris aparecerá a valores no suficientemente próximos al punto final. Para evitar esto debe trasladarse la curva hacia arriba y a la derecha lo que se consigue mediante la adición de otro colorante (azul de timol) que aporte una componente roja, siendo inerte en las condiciones de trabajo.

Para fijar la cantidad de azul de timol se adicionan diferentes cantidades de éste sobre una solución que contiene 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,30 ml de Neozapon 0,1 %, 38,4 mg de metformina y 4,95 ml de HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M. Se obtienen los valores de X, Y, Z según el procedimiento descrito anteriormente y las coordenadas cromáticas para cada punto. De los resultados obtenidos se toman para realizar las siguientes medidas espectrofotométricas las cantidades que a continuación se dan: 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,30 ml de neozapon 0,1 % y 0,1 ml de azul de timol 0,05 %. Los resultados obtenidos figuran en las tablas 67 , 68 , 69 . La curva III que aparece en las figuras 34 y 35 , representa la transición de color en estas condiciones, se observa que la transición de color está cerca del punto gris pero sin pasar por el y además este aparece a valores anteriores al volumen de HClO_4 que corresponde al punto final potenciométrico.

Para conseguir que la transición cromática se desplace hacia abajo y hacia la derecha, con lo que conseguiremos que el punto gris aparezca en las cercanías del punto final, hay que disminuir la componente amarilla lo que implica disminuir la concentración de amarillo de neozapon presente y aumentar la

componente roja, es decir aumentar la concentración de azul de timol. Con este objeto se realizan nuevas medidas espectrofotométricas con las siguientes cantidades de indicador y colorantes inertes: 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,28 ml de Neozapon 0,1 % y 1,12 ml de azul de timol 0,005 %. Los resultados obtenidos se dan en las tablas 70 , 71 , 72 . La curva IV de las figuras 34 y 35 representa dicha transición. Se observa que transcurre por el punto gris por lo que la mezcla en las condiciones determinadas constituye un indicador mixto. Si se aumenta la cantidad de azul de timol (0,12 ml de 0,05 %) la aparición del gris tiene lugar después de adicionados 4,95 ml de HClO_4 $9,21 \cdot 10^{-2}$ M (volumen final potenciométrico 5,02 ml) como lo demuestran las coordenadas cromáticas de dicho punto: CIE 1960 $u = 0,2018$, $v = 0,3073$; CIE $L^*a^*b^*$ 1976 $a^* = -0,05$ $b^* = 0,02$ y $L^* = 89,86$.

Se prepara el indicador mixto teniendo en cuenta la siguiente relación de concentraciones: 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,28 ml de Neozapon 0,1 % y 0,12 ml de azul de timol 0,05% para un volumen de valoración de unos 50 ml. Los estadios de color que presenta dicho indicador son: rojizo-gris-verde-amarillo, siendo la transición al verde la que marca el punto final en la valoración.

Cada una de las transiciones se evalúa por construcción de los correspondientes gráficos donde se representan $\Delta J/\Delta v$ frente a v (ml) y $\Delta E^*/\Delta v$ frente a v (ml). Estas representaciones aparecen en las figuras 36 y 37 , en ambas se observa que el indicador mixto propuesto presenta una intensidad de pico superior a la del violeta de metilo, a la vez que una anchura menor lo que puede traducirse en una mayor nitidez y exactitud a la vez que una mayor comodidad en las valoraciones con el indicador mixto

v(ml) v.	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	76652,3	76462,3	101149,6	10938,7	12019,1	7966,5
2,00	77489,6	77319,4	101406,1	10402,8	11471,3	7833,7
4,00	78144,9	78324,7	101545,8	9975,0	10858,0	7760,8
4,50	78629,4	79250,6	101569,1	9659,9	10312,5	7749,5
4,70	79037,1	80225,0	101574,5	9352,3	9744,0	9748,6
4,80	79342,2	80944,4	101516,8	9171,0	9327,8	7778,7
4,90	80059,3	82574,7	101415,1	8725,6	8422,2	7834,1
5,00	81083,5	84869,2	101051,1	8131,8	7195,6	8027,3
5,10	84267,5	89963,6	99991,1	6497,9	4646,2	8588,5
5,20	87454,8	93317,5	98624,7	4940,5	3042,3	9303,0
5,30	89654,9	95171,8	97762,6	3901,2	2178,9	9766,9
5,50	91398,6	96486,9	97190,5	3103,0	1580,3	10074,6
6,00	92907,3	97599,5	97003,6	2426,9	1092,8	10179,2
7,00	93700,2	98122,8	97075,8	2075,9	851,1	10144,5

Tabla 64.- Valores triestímulus de la transición de color cuando se utilizan: 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 % y 0,16 ml de amarillo de neozapon 0,1 %.

$v(\text{ml})_v$	J	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,09782	-1,85	0,50
1,00	0,09597	-2,00	1,50
2,00	0,09397	-1,55	2,50
3,00	0,09242	-1,97	3,50
4,00	0,09045	-5,52	4,25
4,50	0,08769	-13,66	4,55
4,60	0,08632	-14,07	4,65
4,70	0,08491	-17,91	4,75
4,80	0,08312	-40,99	4,85
4,90	0,07902	-51,50	4,95
5,00	0,07387	-114,53	5,05
5,10	0,06242	-77,27	5,15
5,20	0,05469	-45,64	5,25
5,30	0,05013	-17,25	5,40
5,50	0,04668	-6,76	5,75
6,00	0,04330	-1,95	6,50
7,00			

Tabla 65.- Variación de la concentración óptica en las condiciones de la tabla 64.

$v(\text{ml})_v$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,6507	0,33	1,00
2,00	0,8143	0,41	3,00
4,00	1,1845	2,37	4,25
4,50	1,3177	6,59	4,60
4,70	1,1068	11,07	4,75
4,80	2,2710	22,71	4,85
4,90	3,1914	31,91	4,95
5,00	5,8552	58,55	5,05
5,10	3,5085	35,09	5,15
5,20	2,1383	21,38	5,25
5,30	1,6249	8,13	5,40
5,50	1,2556	2,51	5,75
6,00	0,6246	0,63	6,50

Tabla 66.- Variación de la diferencia de color en las condiciones de la tabla 64.

v(ml) _v	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	76033,1	76962,9	90437,2	-	-	-
2,00	76392,1	76980,8	91211,9	-	-	-
3,00	76411,9	76633,0	91443,9	10928,1	11782,6	13177,9
4,50	76904,3	77441,5	91609,3	10575,6	11274,8	13081,9
4,70	77154,4	78294,5	91339,8	10374,6	10756,8	13237,5
4,80	77426,8	79063,9	91275,6	10182,4	10303,8	13277,8
4,90	78033,4	80482,5	91080,7	9802,9	9494,8	13395,5
5,00	79880,9	84081,6	90476,4	8779,2	7557,1	13761,7
5,05	81707,8	86560,6	89699,9	7843,5	6260,5	14221,4
5,10	83861,1	88769,5	88959,3	6784,5	5198,9	14663,6
5,20	85636,4	90194,7	88390,6	5931,9	4508,3	15001,8
5,30	87052,6	91315,7	88127,5	5267,5	3979,9	15163,9
5,50	88100,3	92011,3	87914,5	4788,2	3657,5	15295,8
6,00	88793,4	92316,9	87373,4	4485,5	3522,9	15613,3
7,00	88879,2	92021,5	86632,4	4467,1	3572,3	16043,9

Tabla 67.- Valores triestímulus de la transición de color cuando se utilizan: 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,3 ml de amarillo de neozapon 0,1 % y 0,1 ml de azul de timol 0,05 %.

$\nu(\text{ml})_{\nu}$	J	$\Delta J/\Delta \nu \cdot 10^3$	$\bar{\nu}$
3,00	0,11352	-1,43	3,50
4,00	0,11209	-3,20	4,25
4,50	0,11049	-3,30	4,55
4,60	0,11016	-14,47	4,65
4,70	0,10871	-19,11	4,75
4,80	0,10680	-33,88	4,85
4,90	0,10341	-82,06	4,95
5,00	0,09520	-112,07	5,03
5,05	0,08960	-106,25	5,08
5,10	0,08429	-37,63	5,15
5,20	0,08048	-32,64	5,25
5,30	0,07722	-10,60	5,40
5,50	0,07510	-0,76	5,75
6,00	0,07472	1,77	6,50
7,00	0,07649		

Tabla 68. - Variación de la concentración óptica en las condiciones de la tabla 67.

$v(\text{ml})_{v.}$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,850	0,43	1,00
2,00	0,862	0,86	2,50
3,00	0,890	0,59	3,75
4,50	1,506	7,53	4,60
4,70	1,219	12,19	4,75
4,80	2,072	20,72	4,85
4,90	4,754	47,54	4,95
5,00	2,800	55,99	5,03
5,05	2,307	46,14	5,08
5,10	1,715	17,15	5,15
5,20	1,250	12,50	5,25
5,30	0,985	4,92	5,35
5,50	0,947	1,89	5,75
6,00	0,744	0,74	6,50
7,00			

Tabla 69.- Variación de la diferencia de color en las condiciones de la tabla 67.

v(ml) _{v.}	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	75422,6	75821,1	92947,9	11577,0	12337,0	12344,4
2,00	75894,9	75929,3	93781,7	11279,9	12243,5	11876,3
4,00	76136,1	75866,3	94272,9	11102,4	12250,8	11596,9
4,50	76384,1	76419,3	94276,5	10914,5	11902,0	11595,1
4,60	76448,8	76658,9	94208,0	10355,4	11751,0	11633,7
4,70	76604,9	77081,2	94155,9	10735,3	11489,7	11662,7
4,80	76904,4	77831,4	94089,8	10516,7	11034,6	11701,8
4,90	77317,2	78958,9	93951,3	10231,8	10369,3	11782,8
4,95	77921,6	80412,9	93652,9	9848,7	9538,6	11954,9
5,00	79357,1	83083,2	93299,3	9039,4	8085,4	12164,2
5,05	81574,4	86251,3	92422,5	7890,3	6449,1	12669,6
5,10	83501,0	88321,3	91592,5	6927,3	5416,4	13144,6
5,20	86016,5	90459,1	90705,9	5708,9	4378,8	13656,1
5,30	87304,9	91459,8	90350,1	5103,7	3904,6	13867,1
5,50	88605,2	92395,8	89957,2	4509,6	3470,4	14100,3
6,00	89488,6	92879,9	89371,9	4121,2	3253,2	14439,5
7,00	89789,1	92851,8	88817,7	4000,9	3274,9	14757,4

Tabla 70.- Valores triestímulus de la transición de color cuando se utilizan: 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,28 ml de amarillo de neozapon 0,1 % y 1,12 ml de azul de timol 0,005 %.

$v(\text{ml})_{v.}$	J	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
4,00	0,11055	-3,40	4,25
4,50	0,10885	-5,45	4,55
4,60	0,10831	-11,19	4,65
4,70	0,10719	-20,08	4,75
4,80	0,10518	-27,49	4,85
4,90	0,10243	-65,90	4,93
4,95	0,09914	-129,89	4,98
5,00	0,09264	-144,22	5,03
5,05	0,08543	-96,21	5,08
5,10	0,08062	-55,18	5,15
5,20	0,07510	-27,46	5,25
5,30	0,07236	-12,58	5,40
5,50	0,06984	-1,69	5,75
6,00	0,06900		

Tabla 71.- Variación de la concentración óptica en las condiciones de la tabla 70.

$v(\text{ml})_v$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,872	0,44	1,00
2,00	0,720	0,36	3,00
4,00	0,796	1,59	4,25
4,50	0,431	4,31	4,55
4,60	0,674	6,74	4,65
4,70	1,138	11,33	4,75
4,80	1,776	17,76	4,85
4,90	2,188	43,77	4,93
4,95	3,414	68,27	4,98
5,00	3,617	72,33	5,03
5,05	2,252	45,04	5,03
5,10	2,471	24,71	5,15
5,20	1,196	11,96	5,25
5,30	1,239	6,20	5,40
5,50	1,071	2,14	5,75
6,00	0,691	0,69	6,50
7,00			

Tabla 72.- Variación de la diferencia de color en las condiciones de la tabla 70.

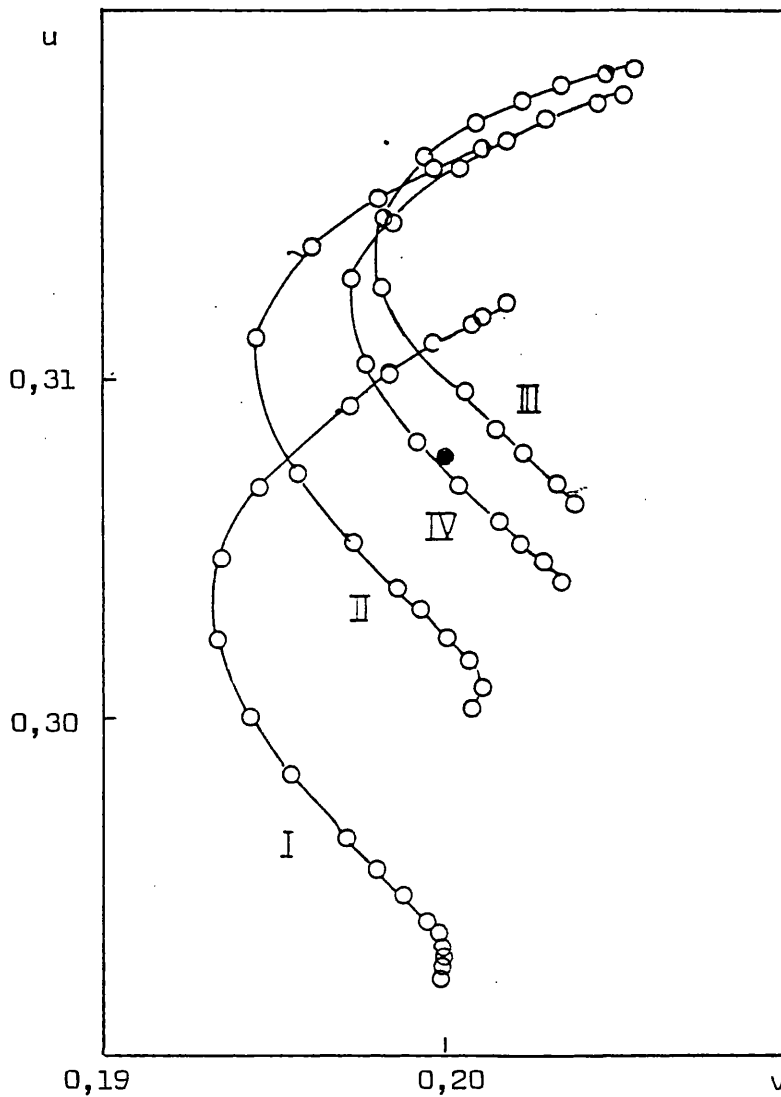


Figura 34.- Curvas de transición de color de las mezclas indicador-colorantes. Sistema CIE 1960.

I.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %; II.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 % y 0,16 ml de amarillo de neozapon 0,1%; III.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,30 ml de am. de neozapon 0,1 % y 0,1 ml de azul de timol 0,05 %; IV.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,28 ml de am. de neozapon 0,1% y 1,12 ml de azul de timol 0,005 %.

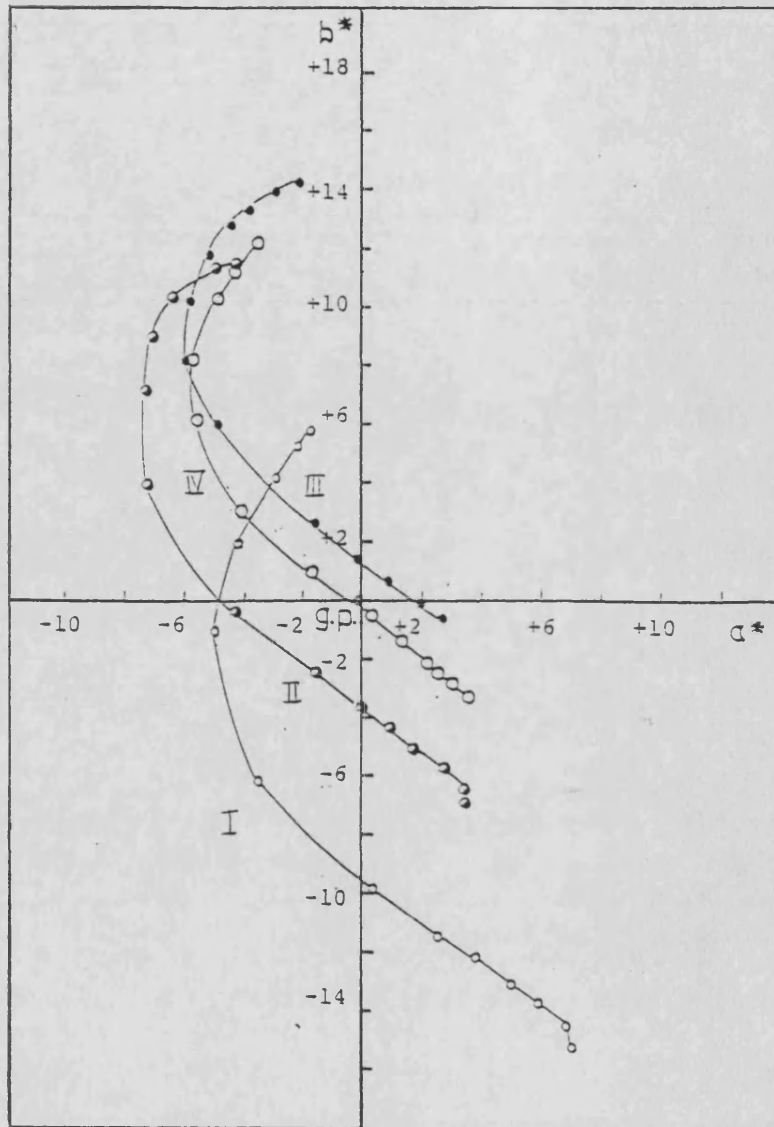
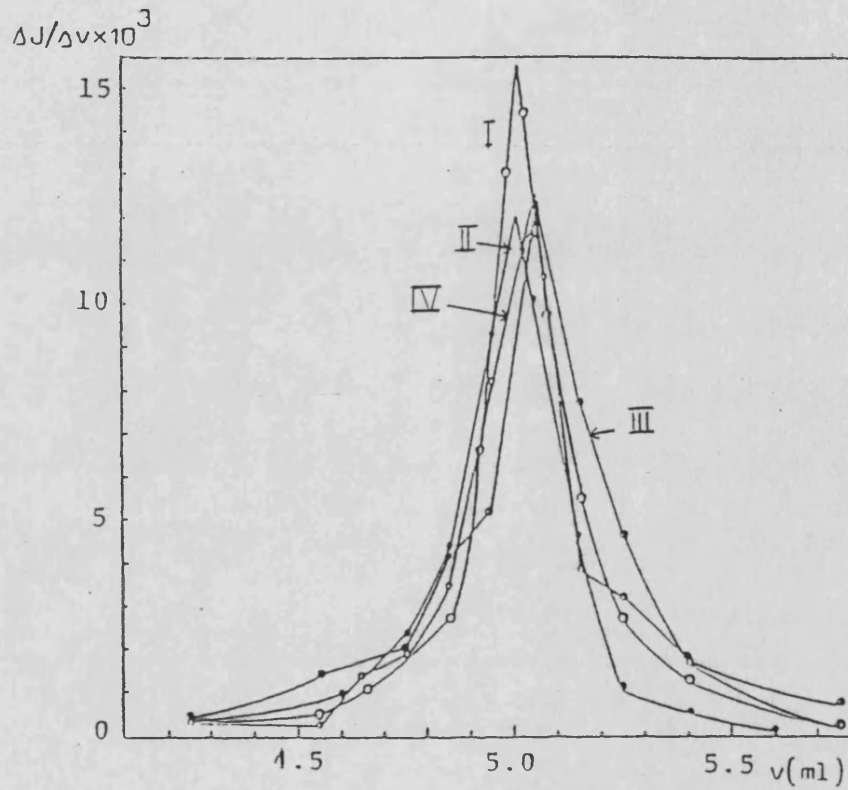
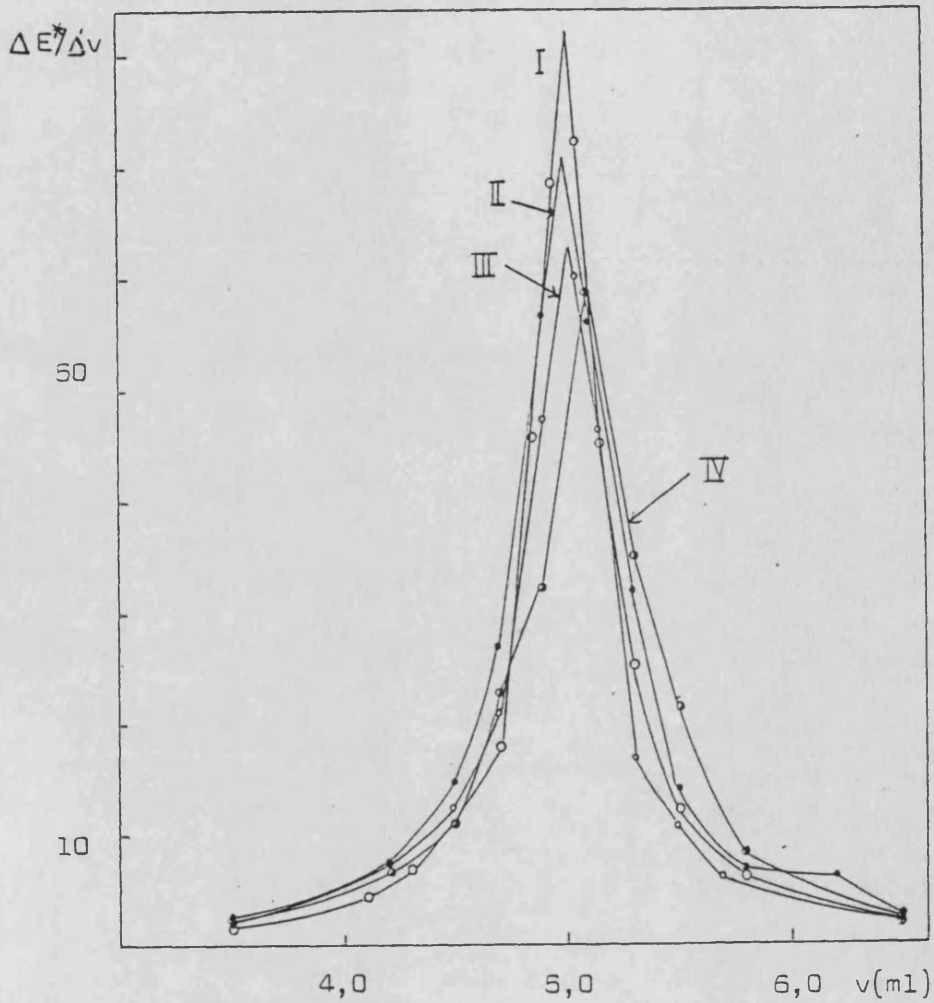


Figura 35.- Curvas de transición de color de las mezclas indicador-colorantes. Sistema CIE $L^*a^*b^*$ 1976. I, II, III, y IV idem a la figura 34.



I.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %; 0,28 ml de amarillo de neozapon 0,1 % y 1,12 ml de azul de timol 0,005 %; II.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 % ; III.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 % y 0,16 ml de amarillo de neozapon 0,1 %; IV.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,30 ml de amarillo de neozapon 0,1 %, y 1,02 ml de azul de timol 0,005 %.

Figura 36.- Variación de la concentración óptica para las mezclas indicador-colorantes.



I.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,28 ml de amarillo de neozapon 0,1 % y 1,12 ml de azul de timol 0,005 %; III.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 %, 0,30 ml de amarillo de neozapon 0,1 % y 1,02 ml de azul de timol 0,005 %; IV.- 0,1 ml de violeta de metilo 0,1 % y 0,16 ml de amarillo de neozapon 0,1 %.

Figura 37.- Variación de la diferencia de color para las mezclas indicador-colorantes.

En la tabla 73 se presentan los resultados obtenidos en las valoraciones visuales. De su analisis se deduce que el indica dor mixto propuesto proporciona mayor exactitud que el simple; las disoluciones conteniendo 3,8 mg de metformin se pueden valorar sin errores superiores al 1,2 % usando el indicador mixto, mientras que 15,4 mg se determinan con errores del orden del 3,2 % con vio leta de metilo. En cuanto a microvaloraciones el indicador mixto proporciona errores aceptables mientras que el violeta de metilo origina errores grandes.

Aunque la precisión es similar con los dos indicadores, si destaca el hecho de que al ser más nítido el viraje con el indicador mixto, se aumenta la sensibilidad en la determinación, ya que para cantidades del orden de 0,8 mg de metformin el viraje con el indicador violeta de metilo no se observa, sin embargo el indicador mixto ofrece aún un viraje suficientemente nítido.



Metformin añadido(mg)	Ind.	Metformin hallada (mg)	\bar{x}	s_r (%)	E_r (%)
38,4	simple	39,1; 39,1; 39,1; 38,9; 39,1.	39,1	0,2	1,7
	mixto	38,5; 38,5; 38,5; 38,5; 38,3.	38,5	0,2	0,1
15,4	simple	15,9; 15,9; 15,8; 15,9; 15,9.	15,9	0,3	3,2
	mixto	15,3; 15,4; 15,4 15,4; 15,3.	15,4	0,3	0,1
3,8(4)	simple	4,16; 4,17; 4,16; 4,15; 4,18.	4,17	0,3	8,5
	mixto	3,89; 3,88; 3,87; 3,89; 3,89.	3,88	0,3	1,2
1,5(3)	simple	1,72; 1,75; 1,72; 1,74; 1,75.	1,74	0,9	13,4
	mixto	1,63; 1,62; 1,63; 1,65; 1,75.	1,63	0,8	5,8
0,7(7)	simple	no se observa viraje	-	-	-
	mixto	0,88; 0,87; 0,85; 0,88; 0,85.	0,87	2,4	13,0

Tabla 73.- Valoraciones visuales. Comparación entre el indicador mixto V M - A N - A T y el violeta de metilo.

II.3.3.2.- VIOLETA CRISTAL - AMARILLO DE NEOZAPON -
AZUL DE TIMOL.

Procedimiento

De la transición cromática del violeta cristal (figuras 29 , 30 , 31) se observa por la similitud con la transición que presenta el violeta de metilo, que los colorantes utilizados en el apartado anterior son adecuados para trasladar la transición, de manera que transcurra por el punto gris en las proximidades del punto final potenciométrico. Por ello, se fija la cantidad óptima de amarillo de neozapon necesaria para trasladar la transición del indicador al lugar preciso, en el diagrama cromático, y después el azul de timol puede hacerla coincidir definitivamente en el punto gris.

Resultados

La aplicación de las fórmulas de REILLEY y SMITH proporciona valores demasiado grandes de volumen de neozapon 0,1 % a tomar; esto es debido a que la concentración de violeta cristal es demasiado elevada. Por ello se toma un volumen de violeta cristal mitad del utilizado para la realización de la transición cromática de dicho indicador (tablas 49 , 54 , 59). A partir de estos datos y teniendo presentes los resultados obtenidos en el apartado anterior se fija empíricamente la cantidad de neozapon en 2,75 ml de 0,01 %, que sitúa la transición cromática en el lugar deseado en el diagrama cromático (curva II en la figura 38); los datos cromáticos de la valoración en estas condiciones (38,4 mg de metformin, 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 % para un volumen de unos 50 ml) se representan en las tablas 74 , 75 , 76 .

El efecto del neozapon se traduce en un desplazamiento de la curva cromática del indicador simple hacia la parte superior izquierda del diagrama cromático CIE $L^*a^*b^*$ 1976.

Por último se fija la cantidad de solución de azul de timol 0,01 %, tal como se procede en el apartado anterior de esta memoria, que resulta ser de 1,00 ml. Efectuada la valoración con la adición conjunta de los dos colorantes, se tabulan los resultados en las tablas 77 , 78 , 79 . La transición cromática corresponde a la curva IV de la figura 38 y transcurre sobre el punto gris como se esperaba.

A modo ilustrativo se realizan las medidas espectrofotométricas empleando el indicador violeta cristal y el azul de timol, cuyos resultados se dan en las tablas 80 , 81 , 82 y la transición cromática en la curva III de la figura 38 . En la misma se observa el efecto de cada colorante independientemente sobre el indicador y cómo conjuntamente logran desplazar la curva del violeta cristal hacia el punto gris. El efecto del azul de timol se traduce en un desplazamiento de la curva del indicador simple hacia la parte inferior derecha del diagrama cromático.

Este indicador mixto propuesto presenta la siguiente secuencia de color: rojizo-gris-amarillo, señalando la aparición del amarillo el punto final. En este caso se ha eliminado el paso a verde que aparece en el indicador mixto desarrollado en el apartado anterior de este trabajo.

En las figuras 39 y 40 se presentan la variación de la concentración óptica y la variación de la diferencia de color respecto al volumen de valorante, respectivamente.

La intensidad del pico correspondiente al indicador mixto es ligeramente superior a las intensidades de pico del violeta cristal-neozapon y violeta cristal-azul de timol. El pico es más agudo que el presentado por el indicador simple, lo que se puede traducir en una mayor exactitud en las valoraciones.

Para las valoraciones visuales se prepara el indicador mixto según la siguiente relación de concentraciones:

0,025 ml de violeta cristal 0,1 % - 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 % - 1 ml de azul de timol 0,01 %.

En la tabla 83 se ofrecen los resultados obtenidos en las valoraciones visuales. De su análisis se deduce que el indicador mixto propuesto proporciona mayor exactitud que el simple, permite la determinación de cantidades hasta 3,8 mg de metformin con errores inferiores al 0,9 %, mientras que el indicador simple para dicha cantidad de muestra presenta un error del 6,8 %.

La precisión es similar para ambos indicadores, sin embargo, al ser más nítido el viraje para el indicador mixto permite determinar cantidades de metformin más bajas con un error aceptable.

Las características de este indicador son similares a las obtenidas para el mixto propuesto en el apartado anterior (violeta de metilo-neozapon-azul de timol), si cabe la ventaja de éste es presentar menor número de estadios de color, lo que puede resultar ventajoso para cualquier operador.

v(ml) _v	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	76860,0	77958,0	95553,1	10659,4	11064,8	10954,6
2,00	77446,0	78598,1	95767,4	10295,2	10668,7	10831,2
4,00	78068,9	79494,4	95998,2	9907,8	10139,7	10700,2
4,50	78396,6	80163,0	96035,9	9692,9	9751,0	10681,6
4,70	78707,5	80907,0	96023,9	9487,9	9325,4	10690,7
4,80	78954,5	81614,5	95931,5	9324,7	8926,6	10797,9
4,90	79536,3	83032,8	95785,4	8944,9	8149,0	10832,4
4,95	80257,7	84453,4	95663,1	8566,9	7394,5	10908,9
5,00	81346,7	86551,3	95222,0	7993,5	6317,3	11161,7
5,05	83710,1	89890,1	94316,7	6815,4	4670,9	11676,4
5,10	85913,4	92101,1	93241,5	5745,9	3609,4	12279,6
5,20	88093,1	93865,7	92373,6	4715,6	2780,0	12769,8
5,50	90018,4	95303,5	91670,8	3838,7	2121,1	13177,7
6,00	90690,5	95737,5	90994,7	3549,7	1927,8	13565,2

Tabla 74.- Valores triestímulus de la transición de color cuando se utilizan: 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 %.

$v(\text{ml})_v$	ΔJ	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,1034	-1,40	1,00
2,00	0,1002	-1,67	3,00
4,00	0,09726	-3,94	4,25
4,50	0,09529	-9,85	4,60
4,70	0,09332	-14,30	4,75
4,80	0,09189	-35,60	4,85
4,90	0,08833	-66,80	4,93
4,95	0,08499	-88,40	4,98
5,00	0,08057	-146,00	5,03
5,05	0,07327	-96,80	5,08
5,10	0,06843	-43,30	5,15
5,20	0,06410	-11,90	5,35
5,50	0,06053	-0,60	5,75
6,00	0,06023		

Tabla 75.- Variación de la concentración óptica en las condiciones de la tabla 74.

$v(\text{ml})_v$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	0,478	0,24	1,00
2,00	0,850	0,43	3,00
4,00	0,868	1,74	4,25
4,50	1,057	5,29	4,60
4,70	1,144	11,44	4,75
4,80	1,929	19,29	4,85
4,90	1,880	37,60	4,93
4,95	2,707	54,14	4,98
5,00	3,659	73,19	5,03
5,05	2,467	49,34	5,08
5,10	2,151	21,51	5,15
5,20	1,870	6,23	5,35
5,50	0,813	1,63	5,75
6,00			

Tabla 76.- Variación de la diferencia de color en las condiciones de la tabla 74.

v(ml) _{v.}	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	79662,2	80328,9	96330,3	9088,2	9702,4	10521,6
2,00	79824,6	79736,2	97328,8	8995,5	10019,7	9980,7
4,00	79774,8	78947,7	98393,6	9017,4	10460,2	9412,4
4,50	79978,7	79407,9	98467,3	8869,1	10183,1	9375,7
4,70	80283,9	80177,9	98432,9	8657,6	9727,8	9396,6
4,80	80790,5	81332,1	98368,1	8339,5	9069,4	9434,6
4,90	81983,5	83912,5	97719,8	7655,2	7658,2	9787,4
4,95	83734,8	86563,2	97134,3	6757,5	6289,3	10110,5
5,00	86008,0	88924,9	95931,8	5648,9	5119,1	10761,1
5,03	87277,2	90011,8	95333,9	5046,5	4594,4	11085,9
5,10	88264,2	90724,0	94919,0	4590,8	4260,4	11312,1
5,20	89145,9	91415,1	94634,8	4188,9	3937,8	11470,3
5,50	90089,3	92039,6	94150,3	3768,1	3661,4	11737,9
6,00	90459,7	92247,6	93648,1	3611,9	3559,8	12014,2

Tabla 77.- Valores triestímulus de la transición de color cuando se utilizan: 0,025 ml de violeta cristal 0,1 %, 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 % y 1 ml de azul de timol 0,01 %.

$v(\text{ml})_{v.}$	ΔJ	$\Delta J/\Delta v \cdot 10^3$	\bar{v}
0,00	0,09272	-0,50	1,00
2,00	0,09172	-0,17	3,00
4,00	0,09138	-2,92	4,25
4,50	0,08992	-10,20	4,60
4,70	0,08788	-29,70	4,75
4,80	0,08491	-55,10	4,85
4,90	0,07940	-123,00	4,93
4,95	0,07325	-103,00	4,98
5,00	0,06810	-50,80	5,03
5,05	0,06556	-35,60	5,08
5,10	0,06378	-17,90	5,15
5,20	0,06199	-4,63	5,35
5,50	0,06060	0,18	5,75
6,00	0,06069		

Tabla 78.- Variación de la concentración óptica en las condiciones de tabla 77.

$v(\text{ml})_{v.}$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta v$	\bar{v}
0,00	1,849	0,92	1,00
2,00	1,974	0,99	3,00
4,00	0,630	1,26	4,25
4,50	1,149	5,74	4,60
4,70	1,632	16,32	4,75
4,80	3,504	35,04	4,85
4,90	3,041	60,82	4,93
4,95	2,693	53,86	4,98
5,00	1,316	26,33	5,03
5,05	0,992	19,84	5,08
5,10	0,822	8,22	5,15
5,20	0,998	3,33	5,35
5,50	0,576	1,15	5,75
6,00			

Tabla 79.- Variación de la diferencia de color en las condiciones de la tabla 77.

v(ml) _{v.}	color verdadero			color complementario		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,00	81786,8	80302,7	112154,8	8040,2	9760,5	2659,3
2,00	81831,8	79626,2	113200,3	8031,2	10132,6	2188,1
4,00	81703,4	78634,1	114466,3	8129,3	10706,1	1624,8
4,50	81802,3	78888,1	114541,9	8049,3	10548,0	1590,8
4,70	81932,6	79284,9	114548,1	7948,4	10307,1	1587,0
4,80	82157,4	79826,1	114516,4	7795,2	9985,8	1600,0
4,90	82479,2	80774,9	114367,2	7572,4	9434,2	1664,6
4,95	82906,5	81731,9	114154,4	7305,3	8889,0	1758,5
5,00	83904,2	83693,7	113790,1	6736,6	7815,3	1919,4
5,05	85521,6	86055,9	112918,6	5879,7	6574,2	2311,7
5,10	87524,7	88125,9	111560,0	4863,9	5524,5	2930,8
5,20	89370,4	89585,2	110256,2	3965,6	4809,6	3532,5
5,50	91027,4	90781,4	109053,9	3195,5	4251,1	4094,2
6,00	91590,4	91133,9	108600,3	2933,8	4078,2	4307,8

Tabla 80.- Valores triestímulus de la transición de color cuando se utilizan: 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 1 ml de azul de timol 0,01 %.

$\bar{\nu}(\text{ml})_{\nu}$	ΔJ	$\Delta J/\Delta \nu \cdot 10^3$	$\bar{\nu}$
0,00	0,06472	-0,17	1,00
2,00	0,06438	0,17	3,00
4,00	0,06472	-1,72	4,25
4,50	0,06386	-5,50	4,60
4,70	0,06276	-14,60	4,75
4,80	0,06130	-22,40	4,85
4,90	0,05906	-45,40	4,93
4,95	0,05679	-93,80	4,98
5,00	0,05210	-107,80	5,03
5,05	0,04671	-91,60	5,08
5,10	0,04213	-32,00	5,15
5,20	0,03893	-8,10	5,35
5,50	0,03650	-1,38	5,75
6,00	0,03581		

Tabla 81.- Variación de la concentración óptica en las condiciones de la tabla 80.

$\nu(\text{ml})_{\nu}$	ΔE^*	$\Delta E^*/\Delta \nu$	$\bar{\nu}$
0,00	1,816	0,91	1,00
2,00	2,310	1,16	3,00
4,00	0,369	0,74	4,25
4,50	0,632	3,16	4,60
4,70	0,792	7,92	4,75
4,80	1,524	15,24	4,85
4,90	1,399	27,97	4,93
4,95	2,628	52,57	4,98
5,00	2,833	56,66	5,03
5,05	2,473	49,47	5,08
5,10	2,054	20,54	5,15
5,20	1,847	6,16	5,35
5,50	0,662	1,32	5,75
6,00			

Tabla 82.- Variación de la diferencia de color en las condiciones de la tabla 80.

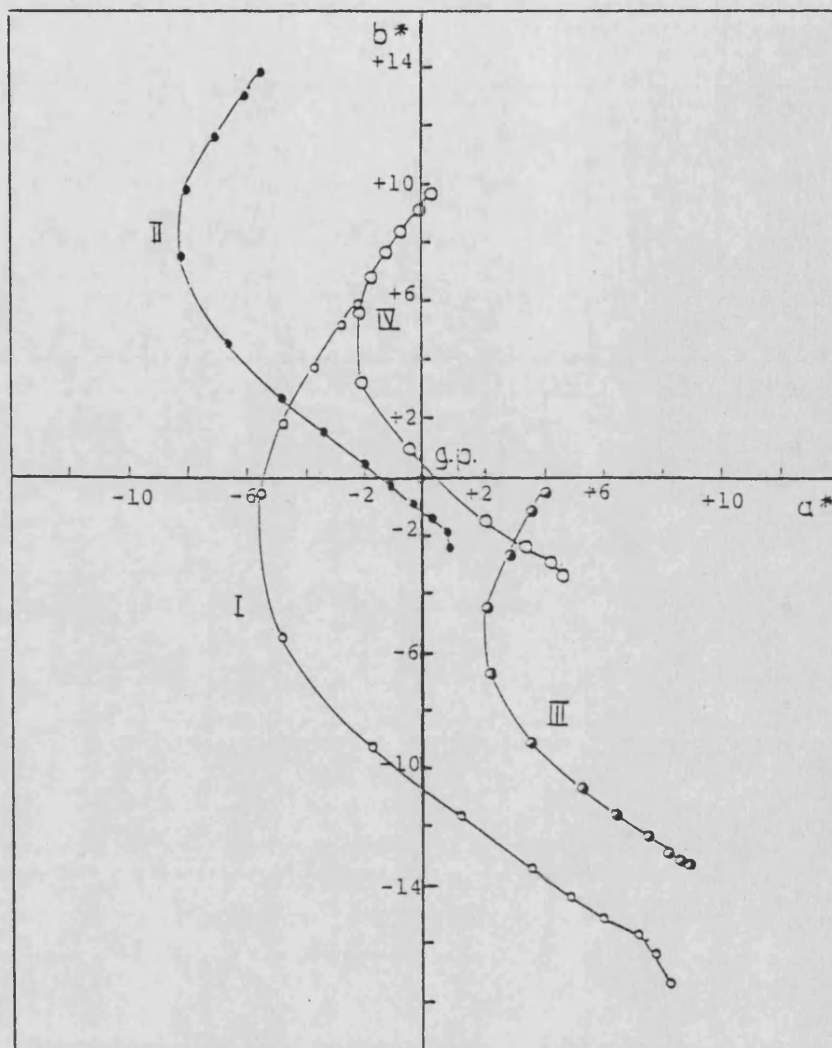
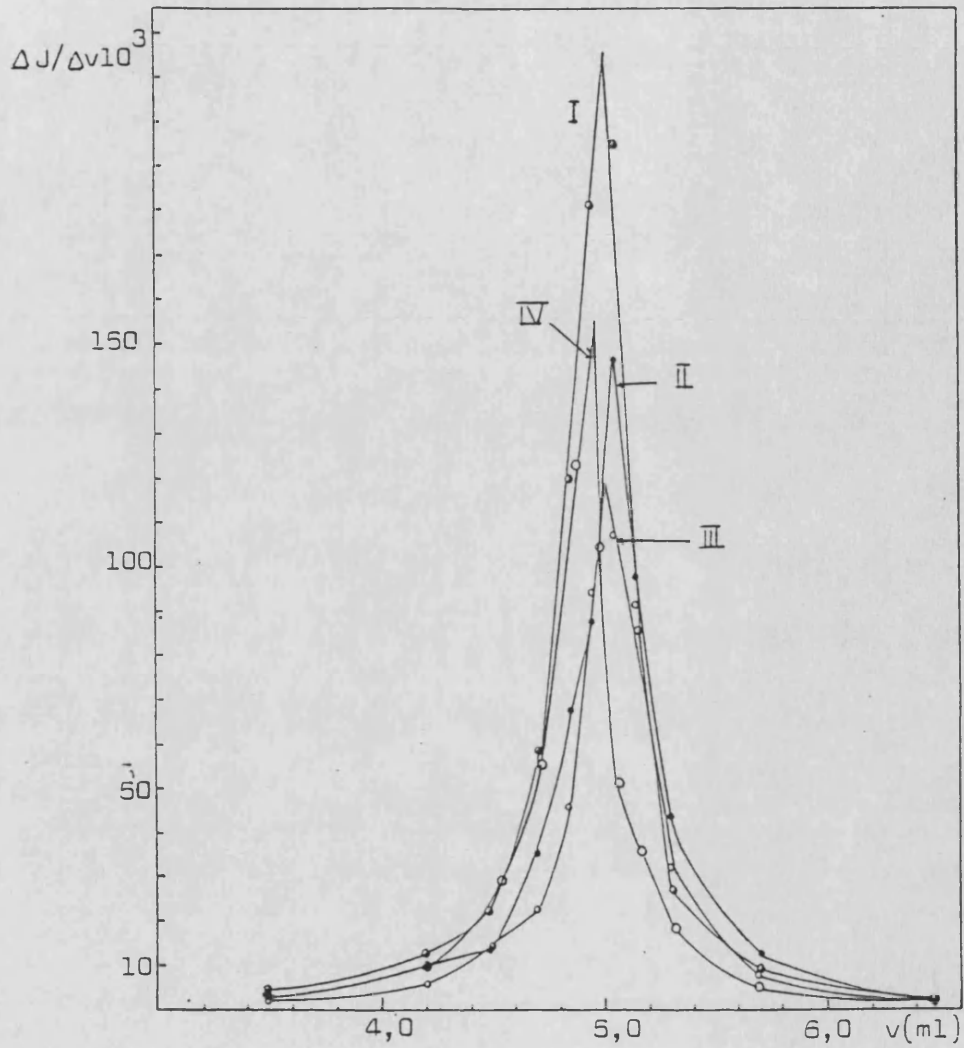


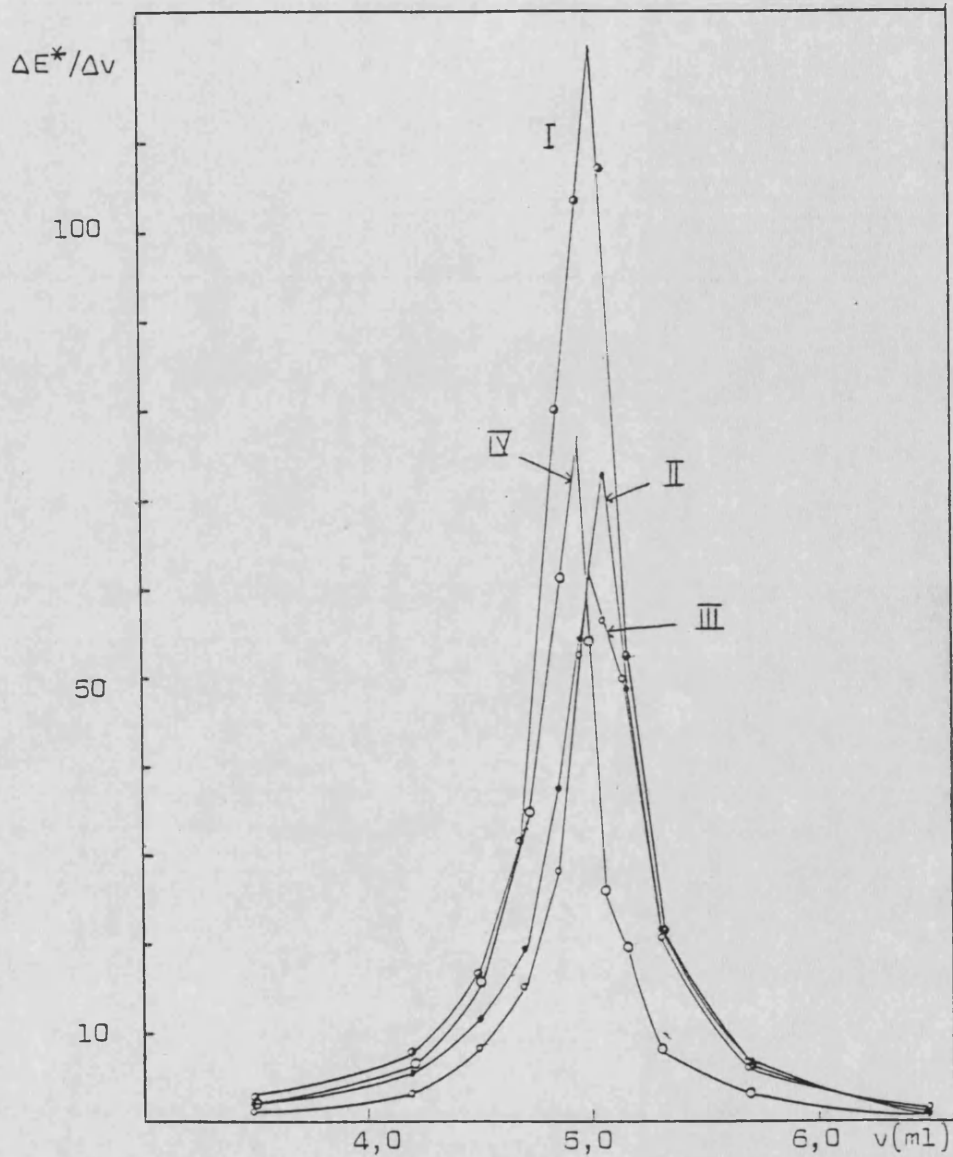
Figura 38.- Curvas de transición de color de las mezclas indicador-colorantes. Sistema CIE L a b 1976.

I.- 0,05 ml de violeta cristal 0,1 %; II.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 %; III.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 1 ml de azul de timol 0,01 %; IV.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 %, 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 y 1 ml de azul de timol 0,01%.



I.- 0,05 ml de violeta cristal 0,1 %; II.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 %; III.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 %, y 1 ml de azul de timol 0,01 %; IV.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 %, 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 % y 1 ml de azul de timol 0,01 %.

Figura 39.- Variación de la concentración óptica para las mezclas indicador-colorantes.



I.- 0,05 ml de violeta cristal 0,1 %; II.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 %, y 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 %; III.- 0,025 ml de violeta cristal 0,1 % y 1 ml de azul de timol 0,01 %; IV.- 0,025 ml violeta cristal.0,1 %, 2,75 ml de amarillo de neozapon 0,01 % y 1 ml de azul de timol 0,01 %.

Figura 40.- Variación de la diferencia de color para las mezclas indicador-colorantes.

Metformin añad. (mg)	Indicador	Metformin hallada (mg)	\bar{x}	s_r (%)	E_r (%)
38,4(2)	simple	38,90; 38,52; 38,52; 38,71; 38,52.	38,63	0,4	0,6
	mixto	38,52; 38,33; 38,52; 38,33; 38,33.	38,41	0,3	0,03
15,3(7)	simple	15,71; 15,64; 15,71; 15,64; 15,86.	15,71	0,6	2,2
	mixto	15,33; 15,41; 15,41; 15,41; 15,33.	15,38	0,3	0,1
3,8(4)	simple	4,08; 4,12; 4,10; 4,12; 4,08.	4,10	0,5	6,8
	mixto	3,85; 3,89; 3,85; 3,87; 3,89.	3,87	0,5	0,9
1,5(3)	simple	1,72; 1,75; 1,72; 1,68; 1,75.	1,72	1,8	12,4
	mixto	1,60; 1,62; 1,60; 1,62; 1,58.	1,61	1,0	4,7
0,7(7)	simple	no se observa viraje	-	-	-
	mixto	0,84; 0,86; 0,88; 0,86; 0,84.	0,85	1,9	11,3

Tabla 83.- Valoraciones visuales. Comparación entre el
indicador V C - A N - A T y el violeta cristal.

II.3.4.- CONCLUSIONES

- Se realizan medidas espectrofotométricas de la valoración de metformin con HClO_4 en medio acético glacial y distintos indicadores. Se establece la transición de color para cada uno de ellos.

- Las transiciones cromáticas más largas corresponden al violeta de metilo y violeta cristal.

- Se representan los diagramas $\Delta J/\Delta v$ y $\Delta E^*/\Delta v$ frente al volumen de valorante adicionado, para cada uno de los indicadores estudiados.

- La mayor concordancia entre el pico máximo y el punto final potenciométrico, del análisis de los dos gráficos, corresponde al violeta cristal y violeta de metilo. Los restantes indicadores presentan errores inferiores al 2%.

- La altura de pico establece la nitidez del viraje, en base a esto, el violeta cristal sobre todo y también el violeta de metilo podrían considerarse como los más nítidos en esta valoración. Siendo también nítido el verde de malaquita, como muestra la figura $\Delta E^*/\Delta v$ frente $v(\text{ml})$ de valorante añadido.

- De lo anteriormente expuesto se proponen como más recomendables en la valoración de biguanidas con HClO_4 en medio acético glacial el violeta cristal y el violeta de metilo; recomendable el verde de malaquita y no recomendables el 0.0 Tropaolin y el púrpura de bromocresol.

- Se buscan indicadores mixtos para mejorar el viraje del violeta de metilo y violeta cristal.

- De las experiencias realizadas se proponen como nuevos indicadores mixtos:

violeta de metilo : amarillo de neozapon : azul de timol

(1,7 : 4,7 : 1)

violeta cristal : amarillo de neozapon : azul de timol

(1 : 11 : 4)

- Las representaciones de la variación de ΔJ y de ΔE^* , demuestran que mejoran la exactitud y la nitidez del viraje, con respecto a los correspondientes indicadores simples.

- Se realizan valoraciones visuales para comparar los resultados obtenidos con el indicador simple y el mixto correspondiente; se logran resultados más exactos para cualquier concentración de metformin a la vez que se mejora la nitidez y la comodidad en la observación del viraje, por lo que ambos indicadores propuestos resultan ventajosos.

II.4.- SISTEMA CLORHEXIDINA - VERDE DE BROMOCRESOL -
TRITON X-100.

Recientemente se han desarrollado diferentes procedimientos extracto-colorimétricos para determinar la clorhexidina en distintos preparados farmacéuticos. Todos ellos están basados en la formación de pares iónicos entre la biguanida en forma catiónica y un reactivo coloreado aniónico: naranja de metilo, azul de timol, verde y púrpura de bromocresol y azul de bromotimol (70)(71)(72)(73).

El par iónico formado es fácilmente soluble en disolventes apolares (el más utilizado es el cloroformo) que actúan como agentes extractantes. Una variable experimental importante para la formación de estos sistemas es el pH del medio ya que se ha de disponer de las formas iónicas adecuadas tanto de la biguanida como del contraión, siendo el pH de precipitación ligeramente ácido ó neutro.

En la bibliografía existente tan solo se encuentra la aplicación analítica de este tipo de compuestos, sin un estudio químico previo de los productos de reacción implicados. Únicamente se ha descrito la estequiometría de la reacción naranja de metilo-clorhexidina, que resulta ser 2:1 (72).

En esta parte de la memoria se procede a estudiar estos sistemas tratando de simplificar los procedimientos analíticos existentes. Para ello se parte de la base de que la solubilización, dispersión ó peptización con agentes tensioactivos de estos pares iónicos puede permitir la evaluación directa de la clorhexidina, obviando el proceso de distribución líquido-líquido.

De los ensayos previos realizados se deduce como más conveniente el sistema Verde de bromocresol-clorhexidina-Triton X-100, desarrollándose el procedimiento analítico resultante en dos mo-

dalidades diferentes:

- 1.- Determinación colorimétrica convencional
- 2.- Determinación colorimétrica mediante análisis por inyección en flujo (FIA).

II.4.1.-ENSAYOS PREVIOS

Utilizando semimicrotubo de ensayo se introducen en este orden: disolución de clorhexidina $2 \cdot 10^{-4}$ M, disolución de contraíón $4 \cdot 10^{-4}$ M ajustándose el medio a pH 5-6 con gotas de tampón acético-acetato y por último se adiciona el agente tensioactivo; la relación biguanida-reactivo coloreado es aproximadamente 1:2. También se preparan disoluciones blanco idénticas pero exentas de clorhexidina.

Los colorantes ensayados son naranja de metilo, verde de bromocresol, azul de timol y púrpura de bromocresol. Los surfactantes no iónicos estudiados: Triton X-100, Emulsogen EL, Nemol K10/30, Emulsogen LP, Emulsogen M, Emulsogen MS y goma arábiga.

La observación visual de dichas reacciones revela un mayor contraste de color entre la disolución que contiene clorhexidina y el blanco correspondiente para el caso del verde de bromocresol que para cualquier otro contraíón. El color de la primera resulta ser verde azulado siendo el de la segunda verde amarillento, observándose que si se adiciona más biguanida que la correspondiente a la relación 1:2 la disolución toma color azul. Las disoluciones correspondientes al azul de timol y púrpura de bromocresol no presentan diferencias de color apreciable.

Se registran los espectros de absorción en el visible de las disoluciones correspondientes al naranja de metilo (Figura 41) y

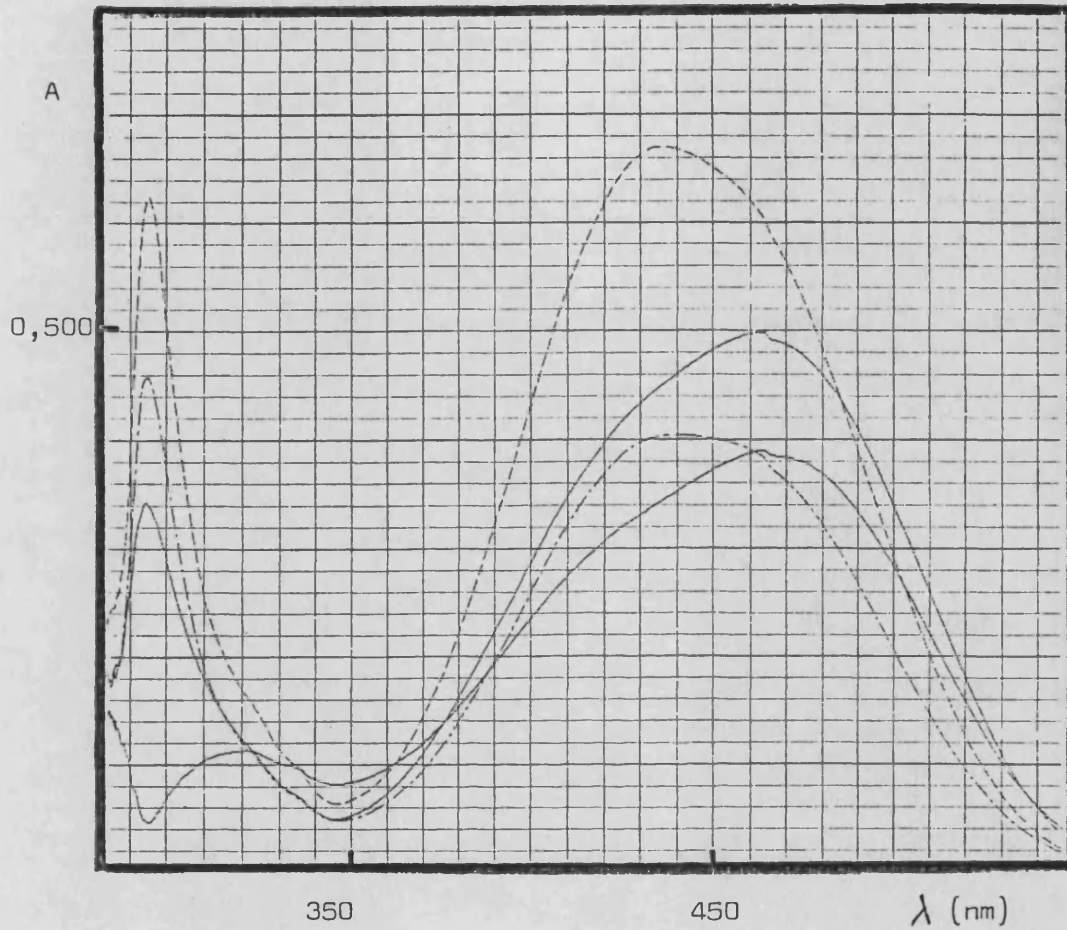


Figura 41.- Espectros correspondientes a disoluciones naranja de metilo-clorhexidina-emulsogen EL. (---) y naranja de metilo-emulsogen EL (—) a distintas concentraciones de tensioactivo. $|N M|_{\text{aprox.}} = 2,4 \cdot 10^{-4}$
 $|Clorh|_{\text{aprox.}} = 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ M.}$

verde de bromocresol (ver figuras 43 y 44) frente a blancos patrón de agua desionizada y se comparan con los espectros de las disoluciones similares pero exentas de clorhexidina frente al mismo blanco. Los espectros muestran que los desplazamientos de las bandas de absorción respecto a las referencias son poco relevantes (valor máximo 20 nm), aunque la presencia de biguanida suele intensificar dichas bandas.

Evaluando los factores desplazamiento e intensificación de las bandas, el colorante resultó ser el verde de bromocresol, ya que incrementa en mayor medida la intensidad de la banda de absorción (máximo 620 nm) aún absorbiendo prácticamente a la misma longitud de onda que la referencia.

De los agentes surfactantes ensayados el Triton X-100 resultó ventajoso ya que proporciona una mayor sensibilización de la reacción a la vez que es un reactivo de fácil acceso comercial.

También se observó que el orden de adición de los reactivos no influía significativamente en el valor de la Absorbancia, por lo que se eligió el siguiente: a la mezcla de verde de bromocresol y clorhexidina se adiciona el tampón y posteriormente el Triton X-100.

Teniendo en cuenta este orden de adición y los espectros obtenidos (valores de absorbancia nulos en determinadas zonas) se puede hablar de solubilización de los pares iónicos por formación de micelas.

Interpretación de los espectros obtenidos

Con el objeto de interpretar los espectros obtenidos en los ensayos previos y los fenómenos que los originan, se han desarro-

llado experiencias que han permitido obtener una serie de consideraciones que se exponen a continuación, apoyándose en los datos bibliográficos referentes al comportamiento del verde de bromocresol en solución acuosa. Se han comparado los espectros de absorción del reactivo en solución acuosa y en presencia de Triton X-100 (0,1 %) y estos últimos con los correspondientes al producto de reacción con clorhexidina.

En la figura 42 se dan los espectros de soluciones acuosas de verde de bromocresol a diferentes valores de pH (El intervalo de transición de color es 3,8-5,4, a pH 3,8 el color de la solución es amarillo y a pH 5,4 azul; $pK = 4,66$ $I = 0,1 M$ (186)) y en la figura 43 los correspondientes a soluciones de reactivo que contienen un 0,1% de trion X-100, observándose un desplazamiento batocrómico de la banda que en solución acuosa aparece con máximo a 615 nm y uno hipocrómico de la correspondiente a 440 nm, este efecto se da generalmente en soluciones acuosas de colorantes que contienen agentes tensioactivos.

La acción del Triton X-100 sobre el verde de bromocresol modifica el equilibrio entre la forma neutra y la aniónica, aumentando el valor de pK , por lo que amplía la zona de existencia de la especie neutra, hecho que se pone de manifiesto en la figura 44. Este mismo efecto se observa si el medio va perdiendo polaridad (186).

Al añadir biguanida a la solución del reactivo en Triton X-100 se observa un efecto hipercrómico de la banda de máximo 620 nm y uno hipocrómico de la que aparece sobre 420 nm, hecho que puede ser explicado teniendo en cuenta que la biguanida protonada favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la especie aniónica del verde de bromocresol en detrimento de la forma neutra.

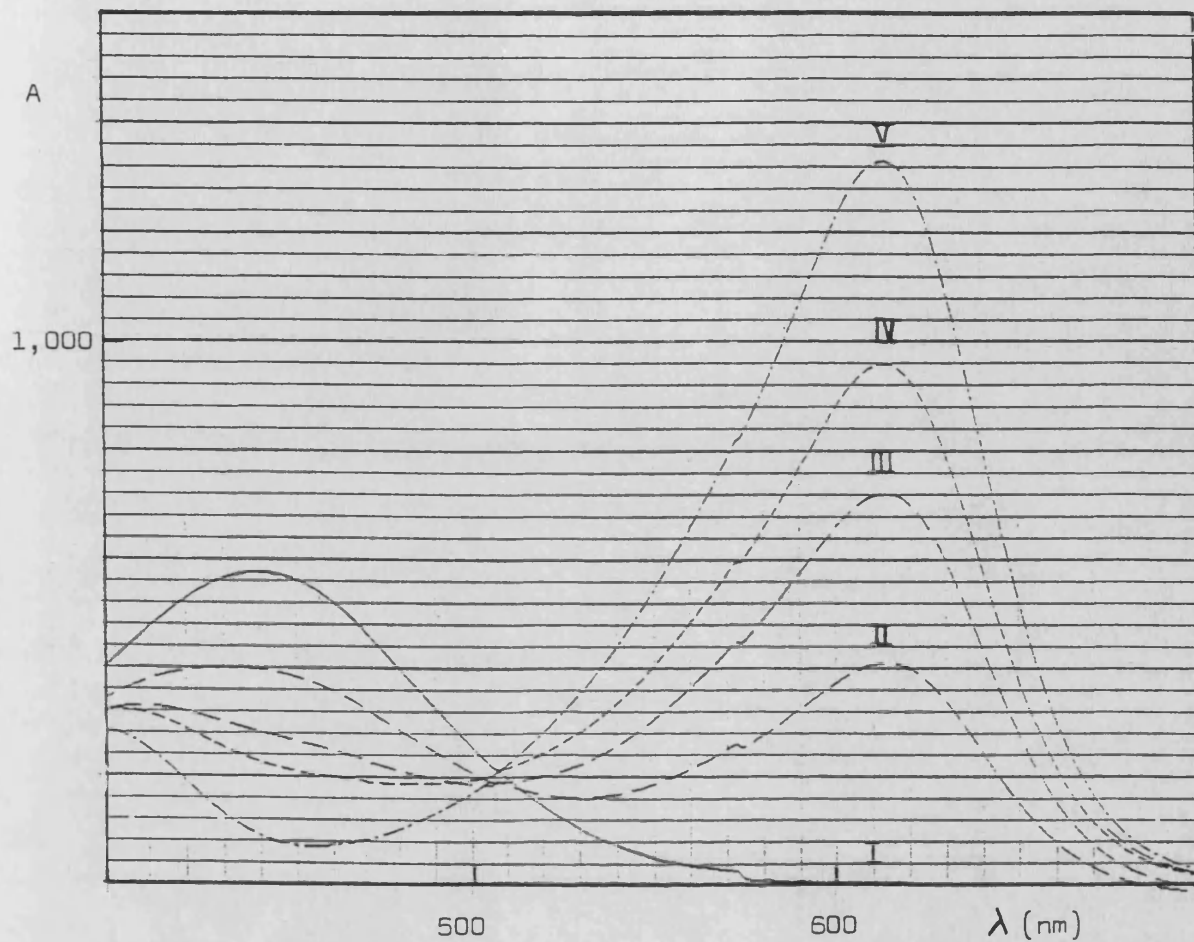


Figura 42.- Espectros correspondientes a disoluciones acuosas de verde de bromocresol $2,9 \cdot 10^{-5}$ M a diferentes pHs. I.- 2,20 , II.- 4,31 , III.- 4,76 , IV.- 5,05 y V.- 11,75.

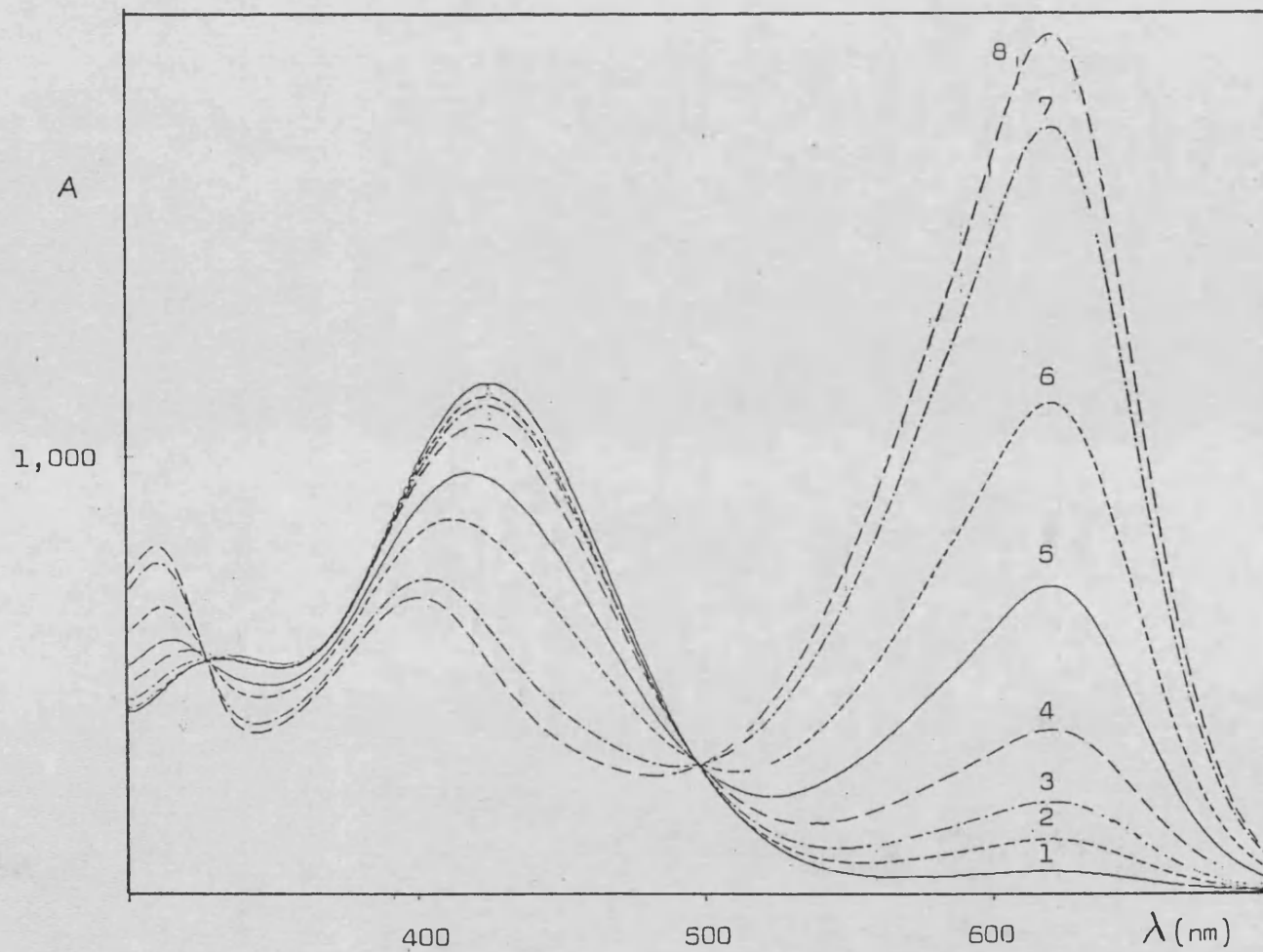
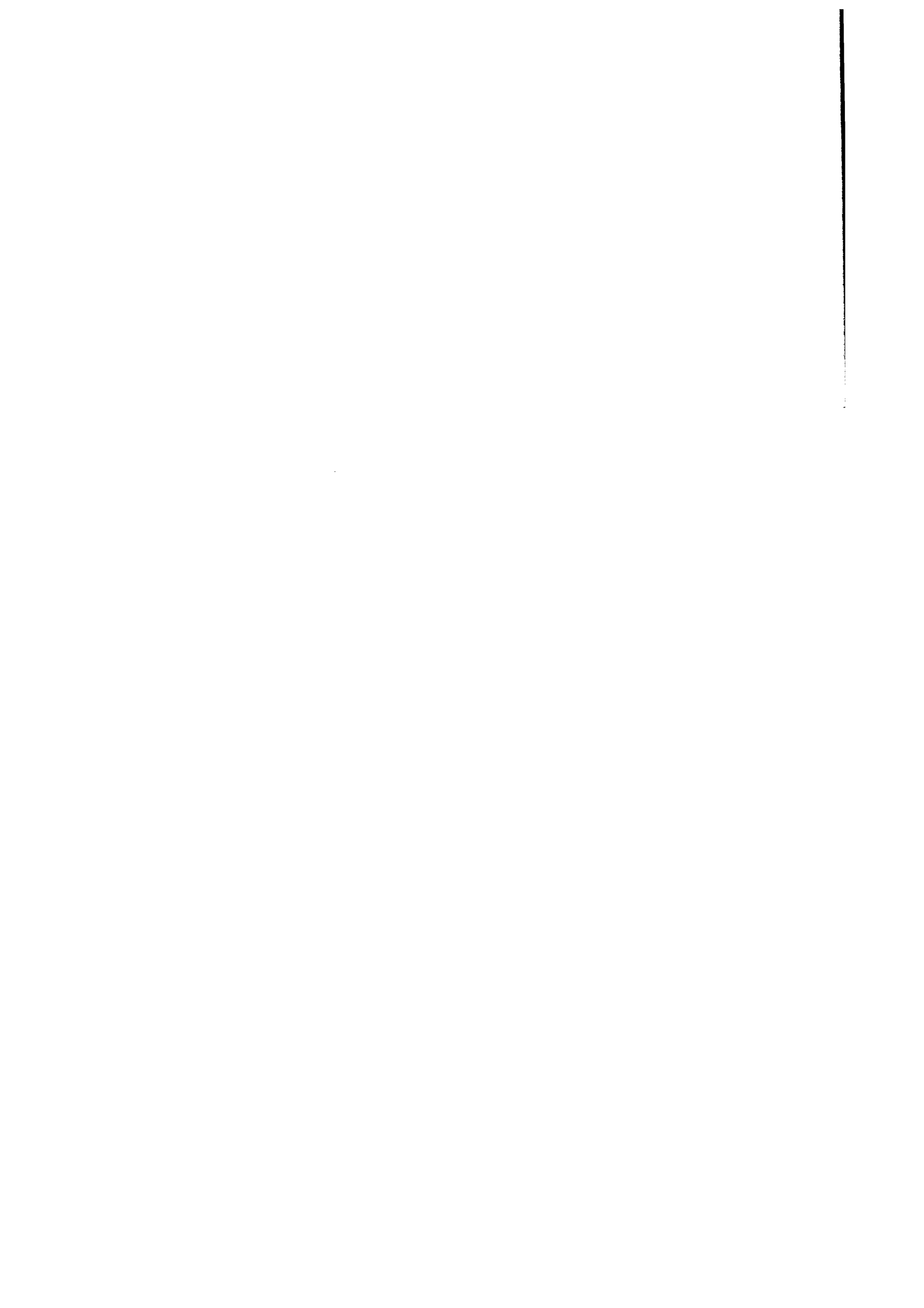


Figura 43.- Espectros correspondientes a disoluciones de verde de bromocresol $6,2 \cdot 10^{-5}$ M y: Triton X-100 0,1 % a diferentes valores de pH: 1.- 3,97 ; 2.- 4,35; 3.- 4,64; 4.- 4,91 ; 5.- 5,27; 6.- 5,59; 7.- 5,97 y 8.- 6,18.



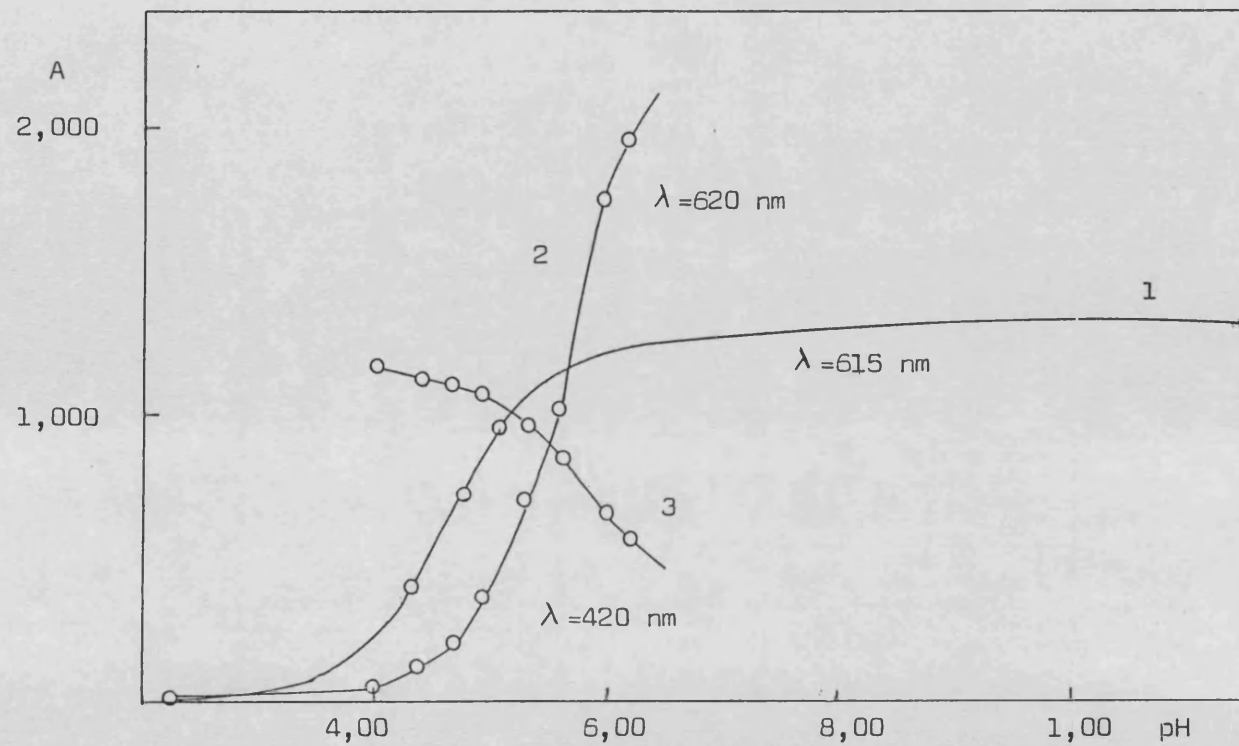


Figura 44.- Curvas $A = f(\text{pH})$ para el verde de bromocresol en medio acuoso ($2,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 1) y en medio Triton X-100 0,1 % ($6,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 2 y 3).

Se elige como longitud de onda de trabajo 630 nm (máximo del espectro de la disolución Verde de Bromocresol-Clorhexidina-Triton X-100 frente a blanco Verde de Bromocresol-Triton X-100; figura 46) por presentar variaciones positivas y más acusadas que las correspondientes a 420 nm.

Las variables que se estudian a continuación son:

- Influencia de la acidez.
- Influencia de la concentración de Triton X-100.
- Influencia de las especies tamponantes.

II.4.2.- INFLUENCIA DEL MEDIO

1.- INFLUENCIA DE LA ACIDEZ

Para conocer la zona óptima de pH en la formación de los productos verde de bromocresol-clorhexidina solubilizados en Triton X-100, se desarrollan los espectros de absorción de varias muestras a diferentes valores de pH en el intervalo 4-6,2.

Método

Las disoluciones se preparan por mezcla de 1 ml de solución de clorhexidina $3,67 \cdot 10^{-4}$ M, 3,2 ml de verde de bromocresol $5,25 \cdot 10^{-4}$ M, 5 ml de mezcla reguladora (Ac^-/HAc , $I=0,5$ M) de pH adecuado, 1 ml de triton X-100 2,5 % y finalmente se lleva el volumen a 25 ml con agua desionizada. El blanco patrón se prepara de la misma forma omitiendo la clorhexidina.

Se registran los espectros de absorción de las disoluciones verde de bromocresol-clorhexidina frente a blanco agua y los de las disoluciones verde de bromocresol-clorhexidina-Triton X-100 frente a blancos agua y disolución exenta de clorhexidina; las

celldas utilizadas son de 1 cm de camino óptico y se termostata a 25°C.

Resultados y discusión

Los espectros registrados se dan en las figuras 43, 45 y 46. En la tabla 84 se dan los valores de absorbancia a 630 nm de las diferentes soluciones verde de bromocresol-clorhexidina frente a blanco patrón y en la figura 47 se representan dichas absorbancias en función del pH, los espectros correspondientes a las citadas disoluciones son los que aparecen en la figura 46. En dicha figura se observa que a medida que aumenta el pH lo hace la intensidad de la banda de absorción (máximo 630 nm), sufriendo el máximo un desplazamiento batocrómico e hipocrómico a partir de pH 5,60.

A la vista de la figura 47 se deduce que el intervalo de pH más adecuado sería el comprendido entre 5,20-5,60, la amplitud del intervalo es pequeña como cabía esperar, puesto que la formación de pares iónicos se dará en la zona donde predominan ambas formas iónicas necesarias.

pH	A	pH	A
3,96	0,020	5,28	0,205
4,36	0,055	5,60	0,207
4,65	0,096	6,00	0,180
4,92	0,140	6,20	0,140

Tabla 84.- Valores de absorbancia a 630 nm y 25°C para disoluciones Verde de bromocresol-clorhexidina-triton X-100 a distintos valores de pH.

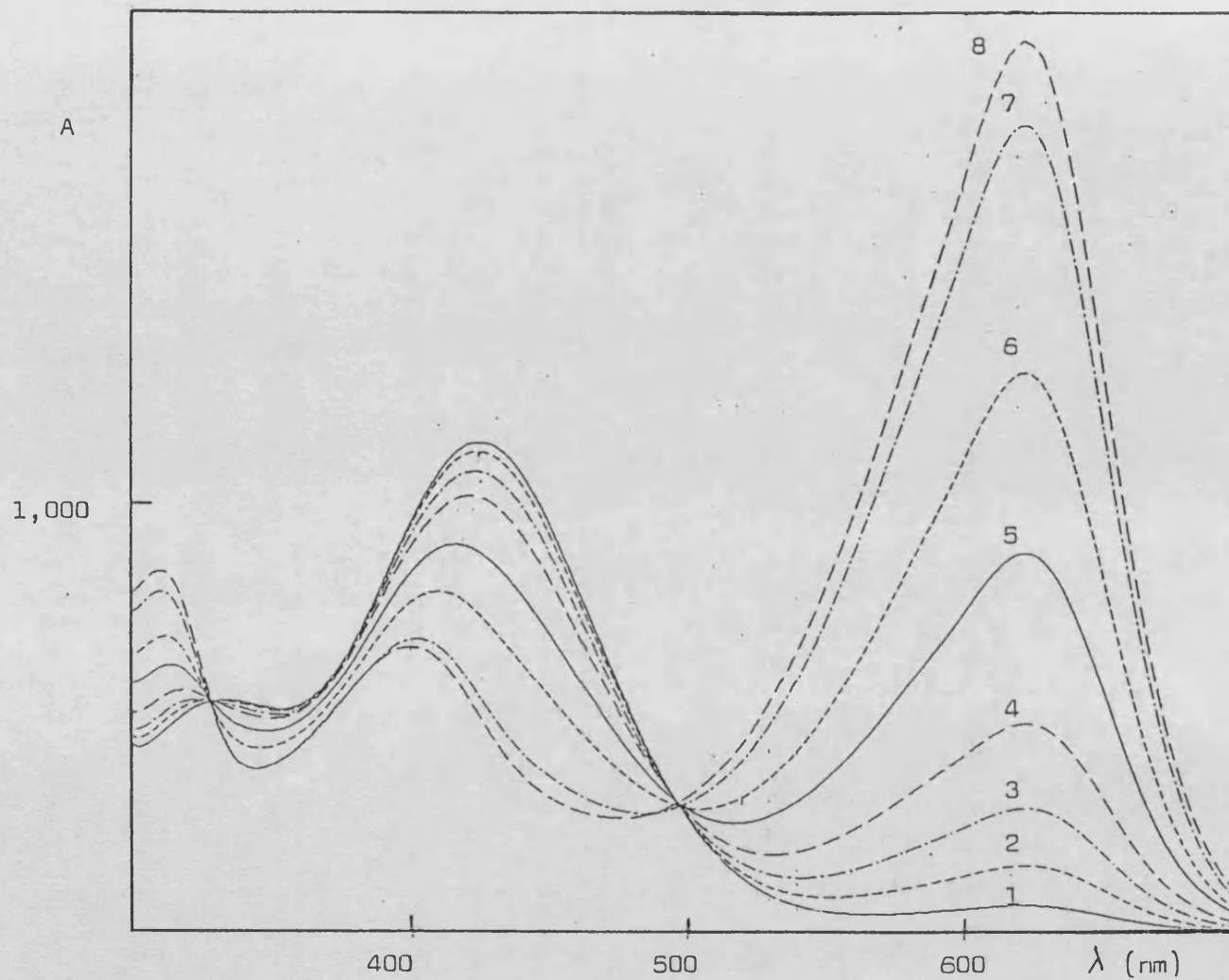


Figura 45.- Espectros correspondientes a disoluciones de clorhexidina $1,47 \cdot 10^{-5}$ M-verde de bromocresol $6,72 \cdot 10^{-5}$ M-triton X-100 0,1 % a diferentes valores de pH: 1.- 3,96; 2.- 4,36; 3.- 4,65; 4.- 4,92; 5.- 5,28; 6.- 5,60; 7.- 6,00 y 8.- 6,20.

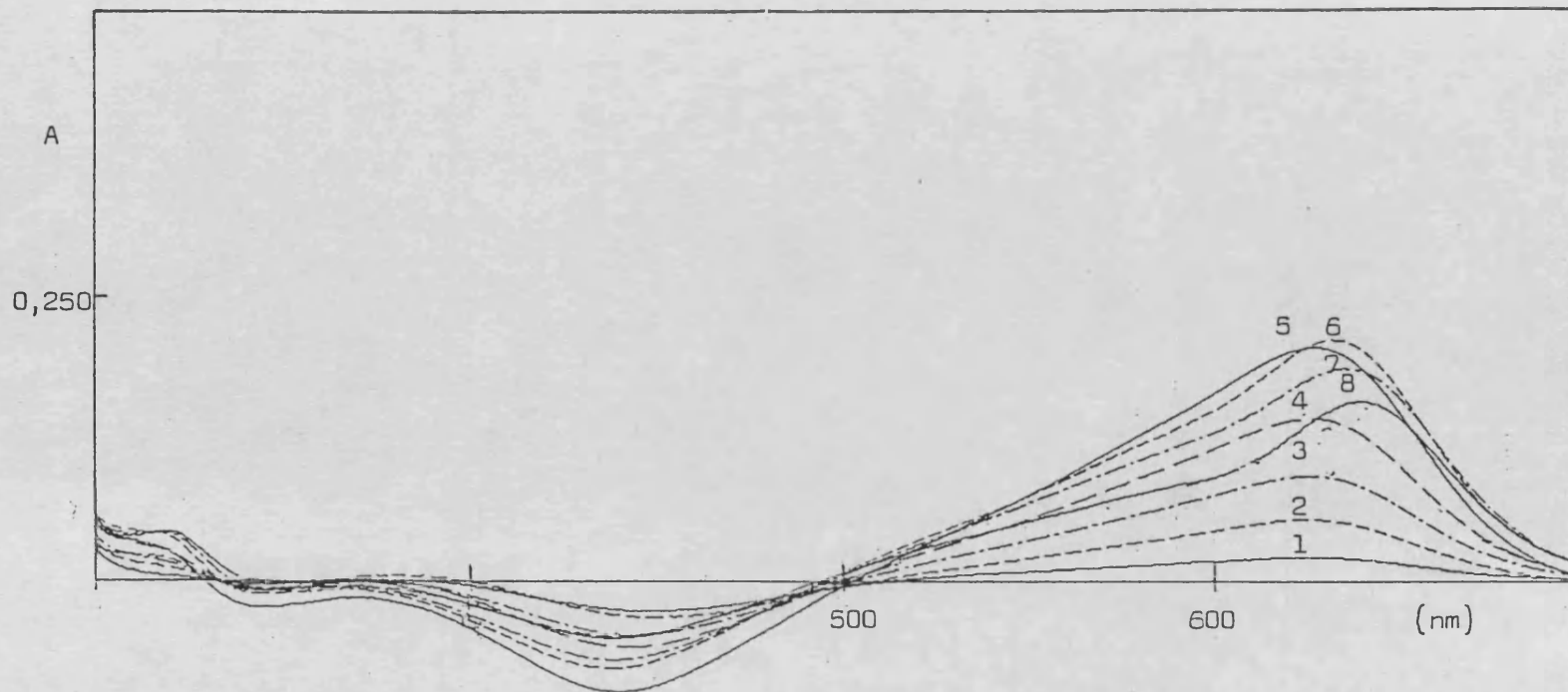


Figura 46.- Espectros correspondientes a disoluciones de clorhexidina $1,47 \cdot 10^{-5}$ M-verde de bromocresol $6,72 \cdot 10^{-5}$ M-triton X-100 0,1 % frente a blanco VB-triton X-100 a diferentes valores de pH: 1.- 3,96; 2.- 4,36; 3.- 4,65; 4.- 4,92; 5.- 5,28; 6.- 5,60; 7.-6,00 y 8.- 6,20.

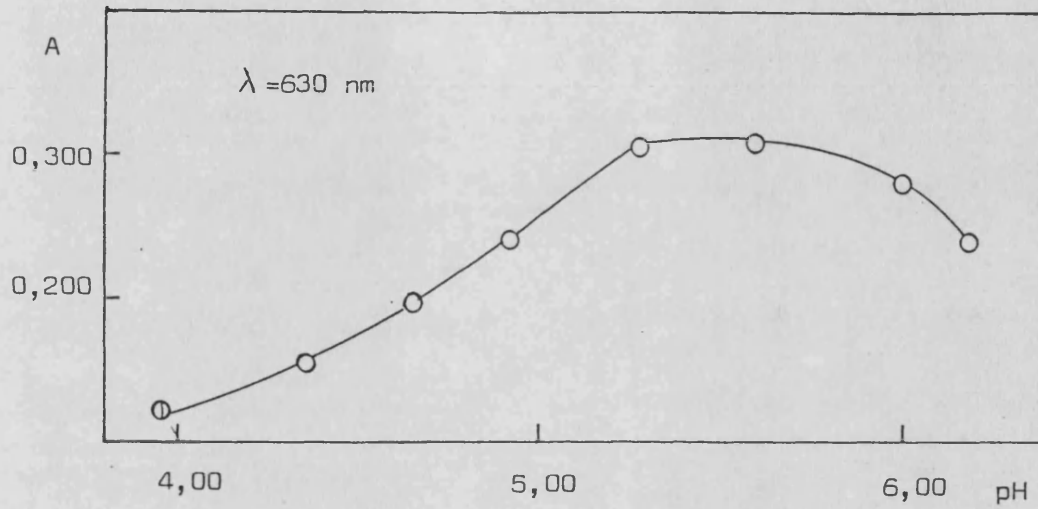


Figura 47.- Influencia del pH en la absorbancia de disoluciones Verde de Bromocresol-Clorhexidina-Triton X-100 . (blanco: verde de cromocresol-Triton X-100).

2.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE TRITON X-100

Método

Se procede a la obtención de los espectros de absorción de las disoluciones verde de bromocresol-triton X-100 y verde de bromoresol-clorhexidina-triton X-100 adecuadamente tamponadas a pH 5,35 (tampón Ac^-/HAc , $I=0,5 \text{ M}$). Como blanco de referencia se utiliza agua desionizada y para el sistema ternario además la primera de las disoluciones citadas. Las celdas empleadas son de 1 cm de camino óptico manteniéndose la temperatura a 25°C.

Las disoluciones correspondientes se preparan pipeteando 2,5 ml de clorhidrato de clorhexidina $3,67 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, 3,5 ml de verde de bromocresol $5,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, 5 ml de tampón de pH 5,35 y distintas cantidades de Triton X-100 2,5 % (0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 5,00 y 10,00 ml) llevando el volumen final a 25 ml.

Resultados y discusión

Los espectros correspondientes se muestran en las figuras 48, 49 y 50. En la tabla 85 se dan los valores de absorbancia a 630 nm y en la figura 51 se representan dichas lecturas frente a la concentración de agente tensioactivo.

Por observación visual se ve que las cantidades de triton X-100 ensayadas mantienen el sistema solubilizado al menos una semana, excepto la concentración de 0,08 % que tan solo lo hace durante un cuarto de hora (espectro 1 de las figuras 49 y 50).

La influencia que sobre las disoluciones verde de bromocresol-triton X-100 y verde de bromocresol-clorhexidina-triton X-100 ejerce la concentración de triton X-100 presente, se manifiesta en el

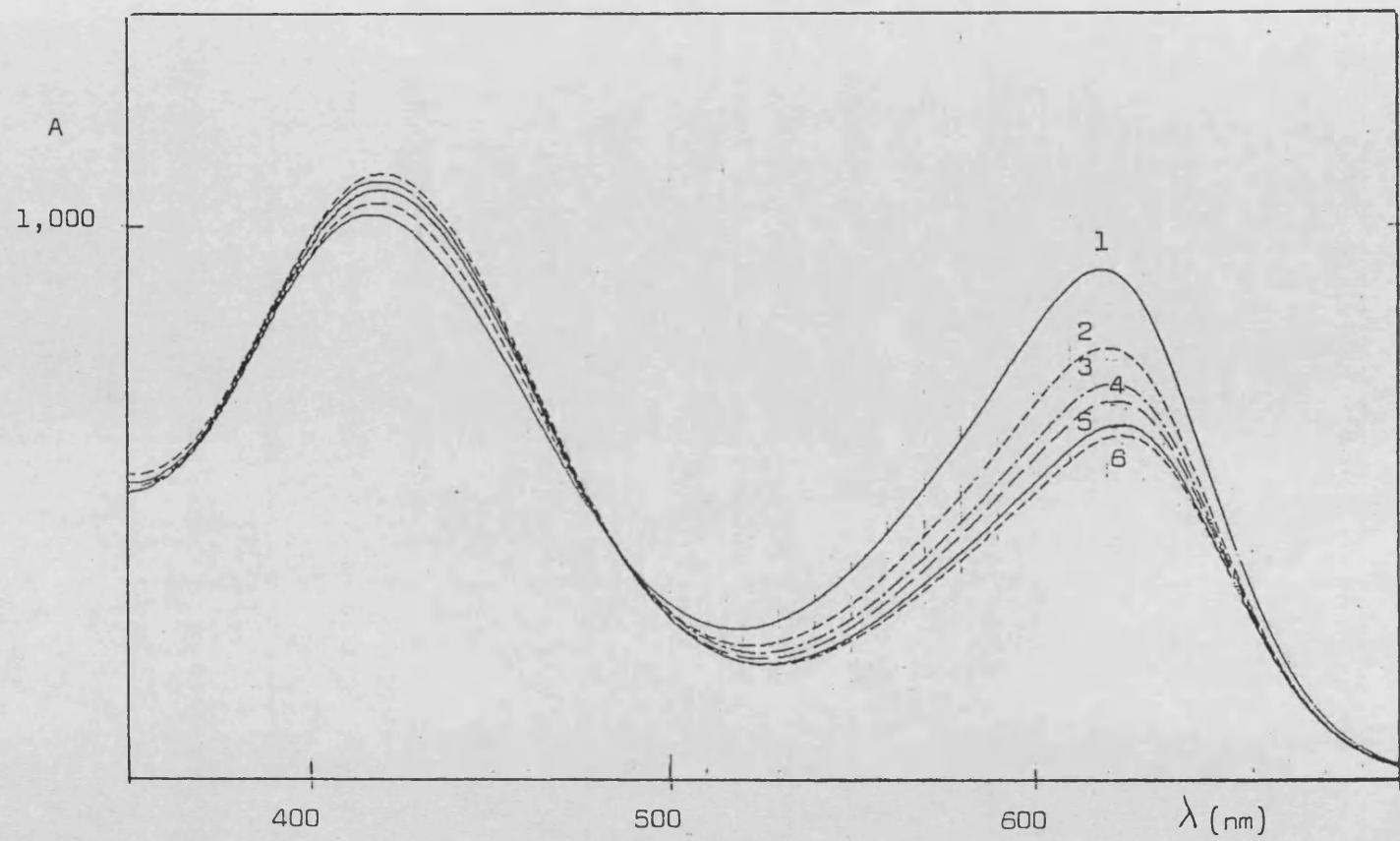


Figura 48.- Espectros correspondientes a disoluciones de verde de bromocresol $7,35 \cdot 10^{-5}$ M y triton X-100 variable : 1.- 0,08 %; 2.- 0,10 %; 3.- 0,15 %; 4.- 0,20 %; 5.- 0,5 % y 6.- 1,0 %.

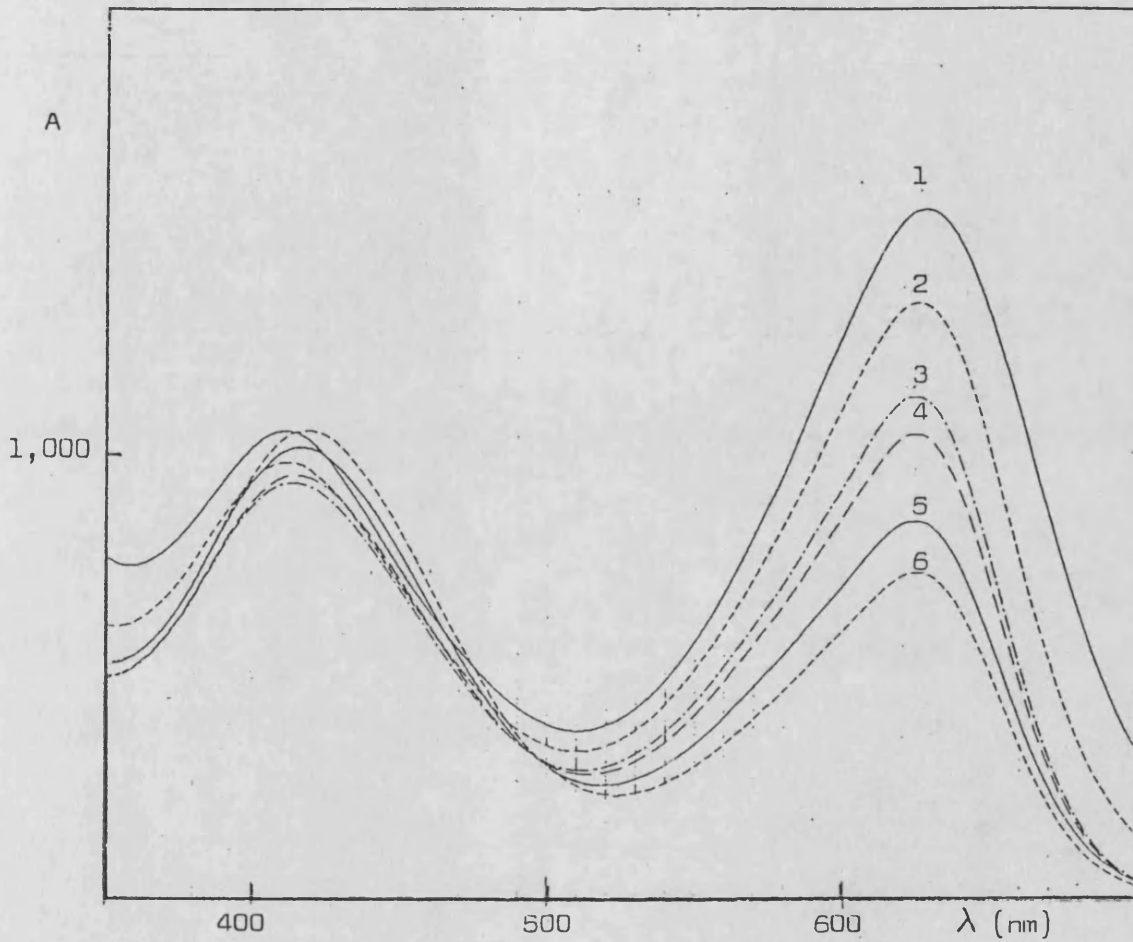


Figura 49.- Espectros correspondientes a disoluciones de verde de bromocresol $7,35 \cdot 10^{-5}$ M -clorhexidina $3,67 \cdot 10^{-5}$ M y triton X-100 variable: 1.- 0,08 %; 2.- 0,10 %; 3.- 0,15 %; 4.- 0,20 %; 5.- 0,5 % y 6.- 1,0 %.

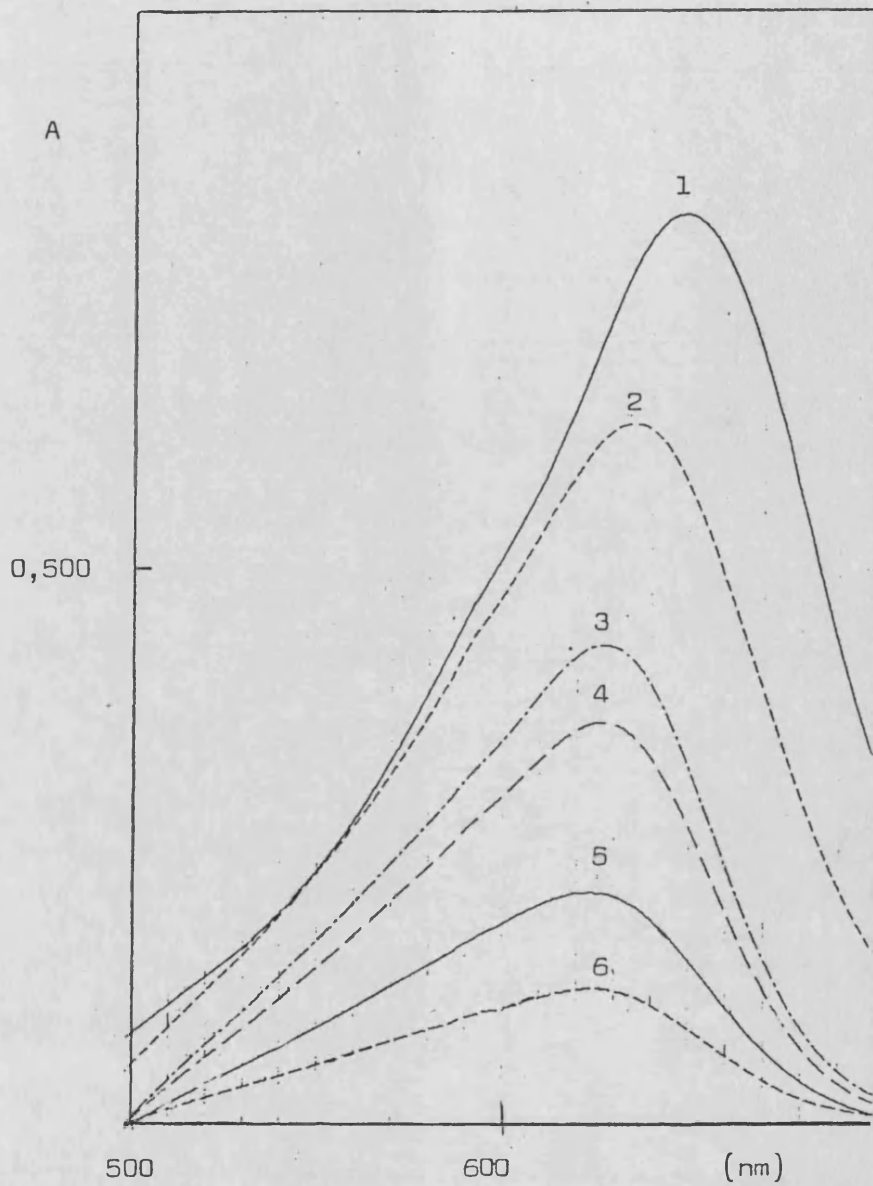


Figura 50.- Espectros correspondientes a disoluciones de verde de bromocresol $7,35 \cdot 10^{-5}$ M-clorhexidina $3,67 \cdot 10^{-5}$ M y triton X-100 variable frente a blanco VB-Triton X-100. 1.- 0,08 %; 2.- 0,10 %; 3.- 0,15 % ; 4.- 0,20 %; 5.- 0,5 %; 6.- 1,0 %.

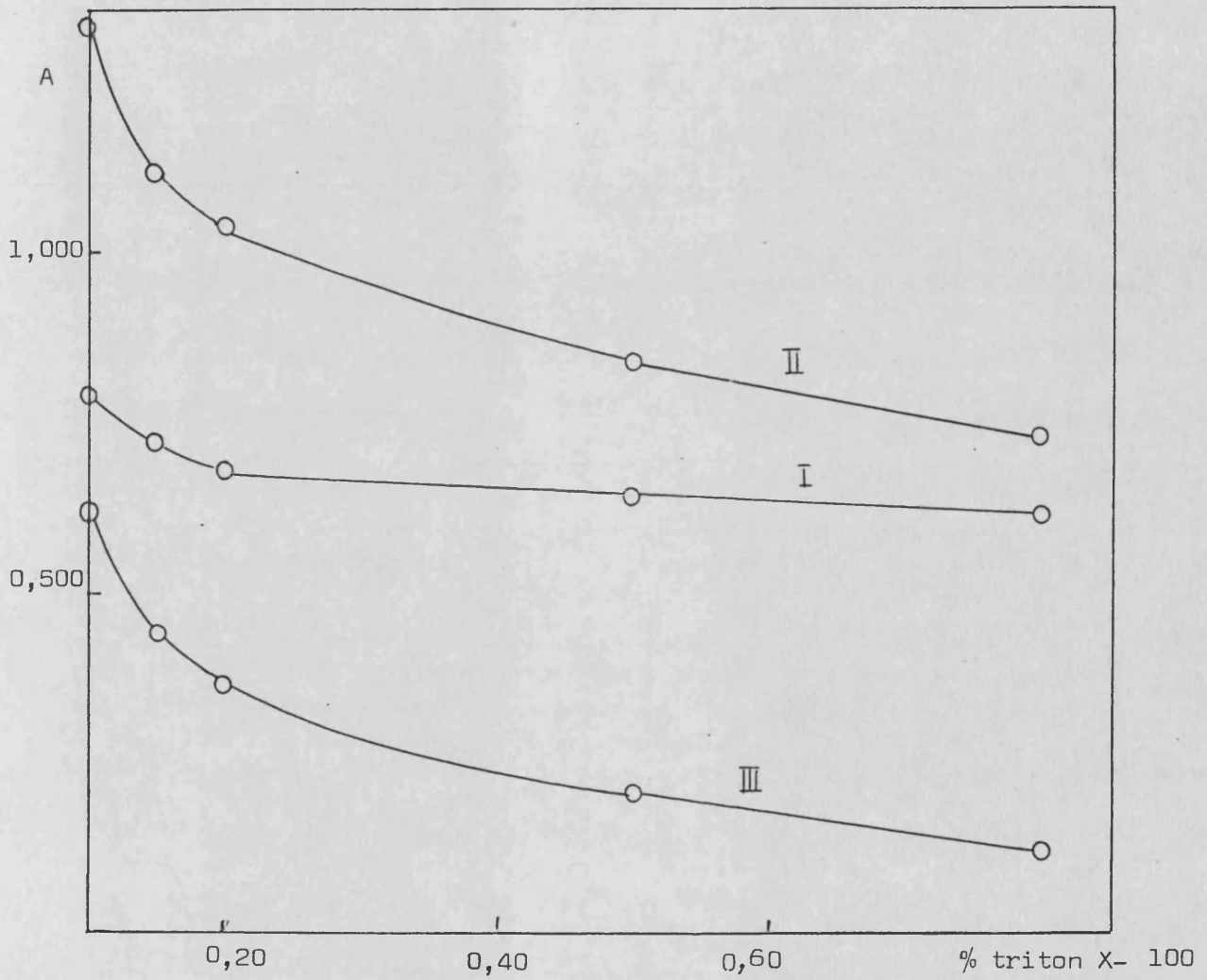


Figura 51.- Influencia de la concentración de triton X-100. Valores de absorbancia a 630 nm de disoluciones que contienen verde de bromocresol ($5,25 \cdot 10^{-5}$ M) y clorhexidina ($3,67 \cdot 10^{-5}$ M) y distintas cantidades de triton X-100 frente a blanco agua (II) y blanco VB- Triton X-100 (III); I.- VB-triton X-100 frente a blanco agua.

mismo sentido, disminuir la absorbancia del máximo correspondiente a medida que aumenta aquella, sin embargo, este efecto es menos acusado en el caso del reactivo (ver figura 51) observándose también un desplazamiento batocrómico de la banda que aparece sobre 620 nm.

En la figura 51 se observa que para concentraciones de triton X-100 superiores al 0,2 % la disminución de absorbancia a 630 nm de la disolución verde de bromocresol-triton X-100 es pequeña y menos acusada para el caso del sistema ternario. A la vista de esto, se puede trabajar con una concentración de tensioactivo de 0,1 % si se quiere que la determinación correspondiente sea más sensible, ganándose seguridad si se trabaja a concentraciones superiores al 0,2 %.

Conc. de Triton X-100 (%)	A ₁	A ₂	A ₃
0,1	0,768	1,335	0,618
0,15	0,722	1,121	0,431
0,2	0,681	1,042	0,360
0,5	0,642	0,841	0,202
1,0	0,620	0,731	0,121

Tabla 85.- Valores de absorbancia a 630 nm y 25°C de disoluciones Verde de bromocresol-Triton X-100 y Verde de bromocresol-Clorhexidina-Triton X-100 frente a blanco agua (A₁ y A₂ respectivamente) y también blanco Verde de bromocresol-Triton X-100 para las segundas (A₃) a distintas concentraciones de Triton X-100.

3.- INFLUENCIA DE LAS ESPECIES TAMPONANTES

Con el objeto de elegir el tampón más adecuado de entre los que cubren la zona óptima de pH adecuada (5,20-5,60), se realizan una serie de experiencias que se exponen a continuación.

Método

Los tampones estudiados son: Acético/Acetato, Ftálico/Ftalato, Cítrico/Citrato, Cítrico/Fosfato y Succínico/Succinato. Se preparan con máxima capacidad reguladora a $I=0,5$ M, siendo el pH 5,35.

Las soluciones se preparan en matraces aforados pipeteando 2 ml de clorhexidina $3,67 \cdot 10^{-4}$ M, 3,5 ml de verde de bromocresol $5,25 \cdot 10^{-4}$ M, 5 ml del tampón correspondiente y 1 ml de triton X-100 2,5%. Se afora a 25 ml con agua desionizada. También se preparan disoluciones blanco patrón de idéntica forma pero exenta de biguanida.

Las medidas de absorbancia se realizan de la forma descrita en los apartados anteriores.

Resultados y discusión

Los espectros correspondientes a las disoluciones biguanida-verde de bromocresol-triton X-100 y verde de bromocresol-triton X-100 se dan en las figuras 52, 53 y 54.

De la observación del gráfico 54 se deduce que los tampones cítrico/citrato, cítrico/fosfato y succínico/succinato proporcionan las mayores diferencias en la absorción entre la disolución con clorhexidina y la del "blanco" (verde de bromocresol-triton X-100). Sin embargo, de éstos tres resulta más adecuado el succínico/succinato ya que intensifica en menor medida la absorción debida al reactivo libre (figura 52).

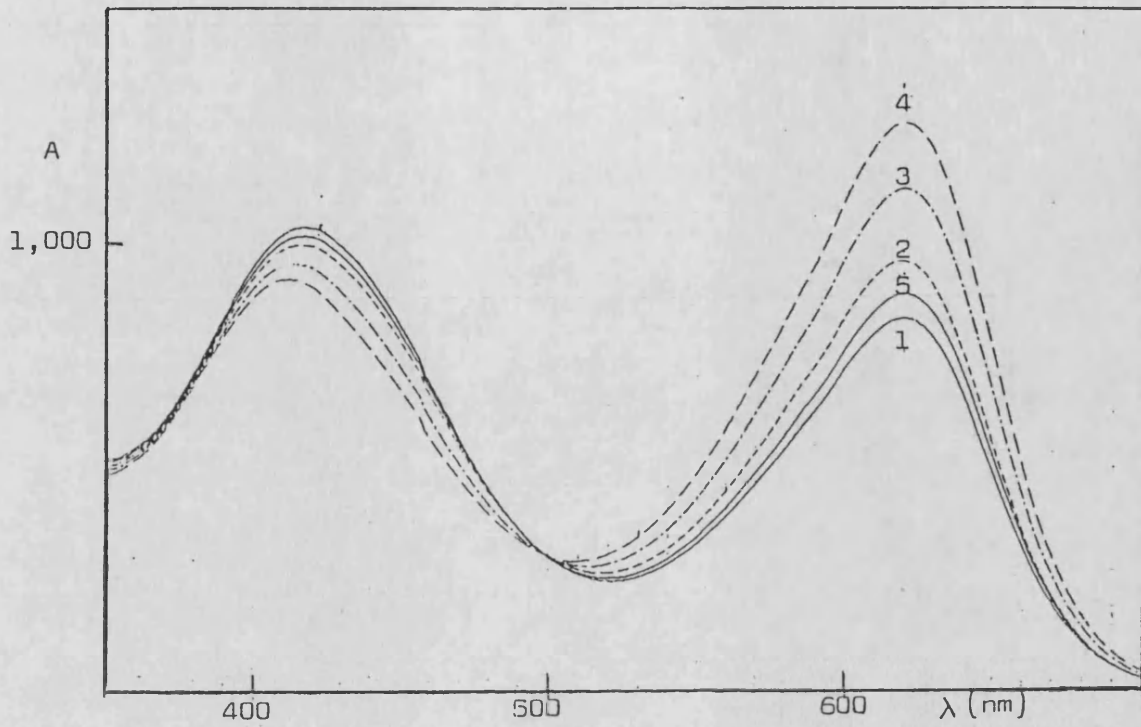


Figura 52.- Espectros correspondientes a disoluciones de verde de bromocresol $7,35 \cdot 10^{-5}$ M - triton X-100 0,1 % tamponadas a pH 5,35 con: 1.- Acético/Acetato; 2.- Ftalico/Ftalato; 3.- Cítrico/Citrato; 4.- Cítrico/Fosfato y 5.- Succínico/Succinato.

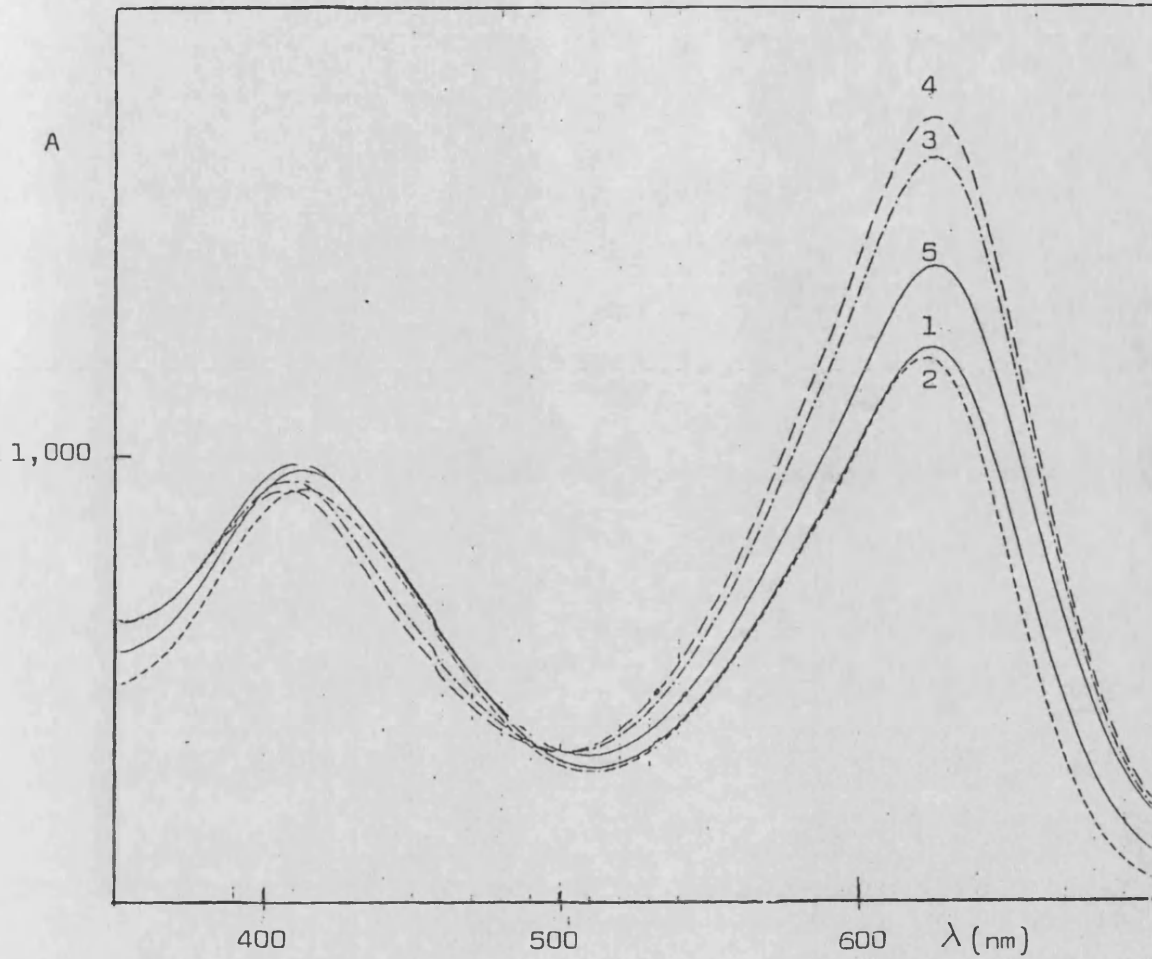


Figura 53.- Espectros correspondientes a disoluciones verde de bromocresol $7,35 \cdot 10^{-5}$ - clorhexidina $2,94 \cdot 10^{-5}$ M - triton X-100 0,1 % tamponadas a pH 5,35 con: 1.- Acético/Acetato; 2.- Ftálico/Ftalato; 3.- Cítrico/Citrato; 4.- Cítrico/Fosfato y 5.- Succínico/Succinato.

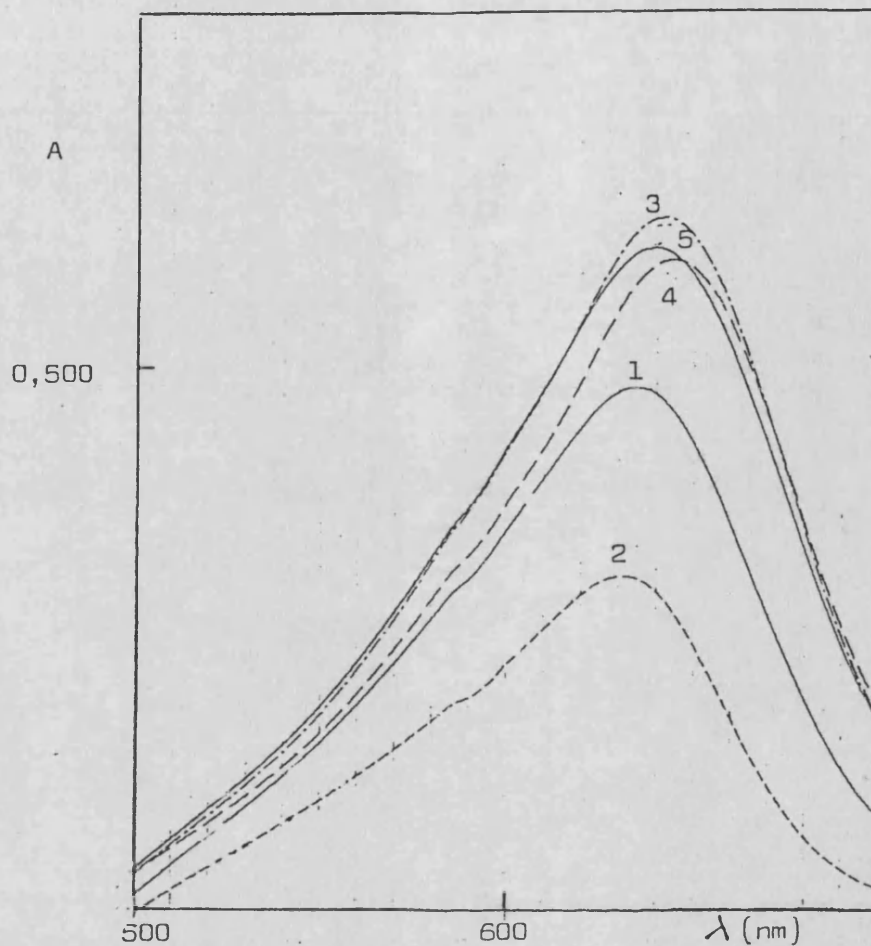


Figura 54.- Espectros correspondientes a disoluciones verde de bromocresol $7,35 \cdot 10^{-5}$ M - clorhexidina $2,94 \cdot 10^{-5}$ M - triton X-100 0,1 % tamponadas a pH 5,35 con: 1.- Acético/Acetato; 2.- Ftálico/Ftalato; 3.- Cítrico/Citrato ; 4.- Cítrico/Fosfato; 5.- Succínico/Succinato. El blanco utilizado es VB-Triton X-100.

II.4.3.- ESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES

Método

Se preparan 3 disoluciones de verde de bromocresol-clorhexidina-triton X-100 en las que la relación de concentraciones se mantiene constante e igual a tres (verde de bromocresol/biguanida), pero con distintas concentraciones de clorhexidina. Paralelamente se preparan los blancos patrón respectivos de verde de bromocresol-trititon X-100, en todos los casos se tampona a pH 5,35 con succínico/succinato (5 ml), siendo la concentración de tensioactivo del 0,1%. El orden de adición de los reactivos es el descrito en los apartados anteriores.

Se toman medidas de absorbancia de las disoluciones, frente a un blanco de reactivo-triton X-100, en el transcurso del tiempo manteniendo las disoluciones a temperatura ambiente y a 630 nm.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se dan en la figura 55. Las soluciones son estables por lo menos 24 horas, disminuyendo la absorbancia a las 48 horas. El porcentaje de pérdida de absorbancia es el mismo para las tres disoluciones y corresponde a un 50 % a las 48 horas.

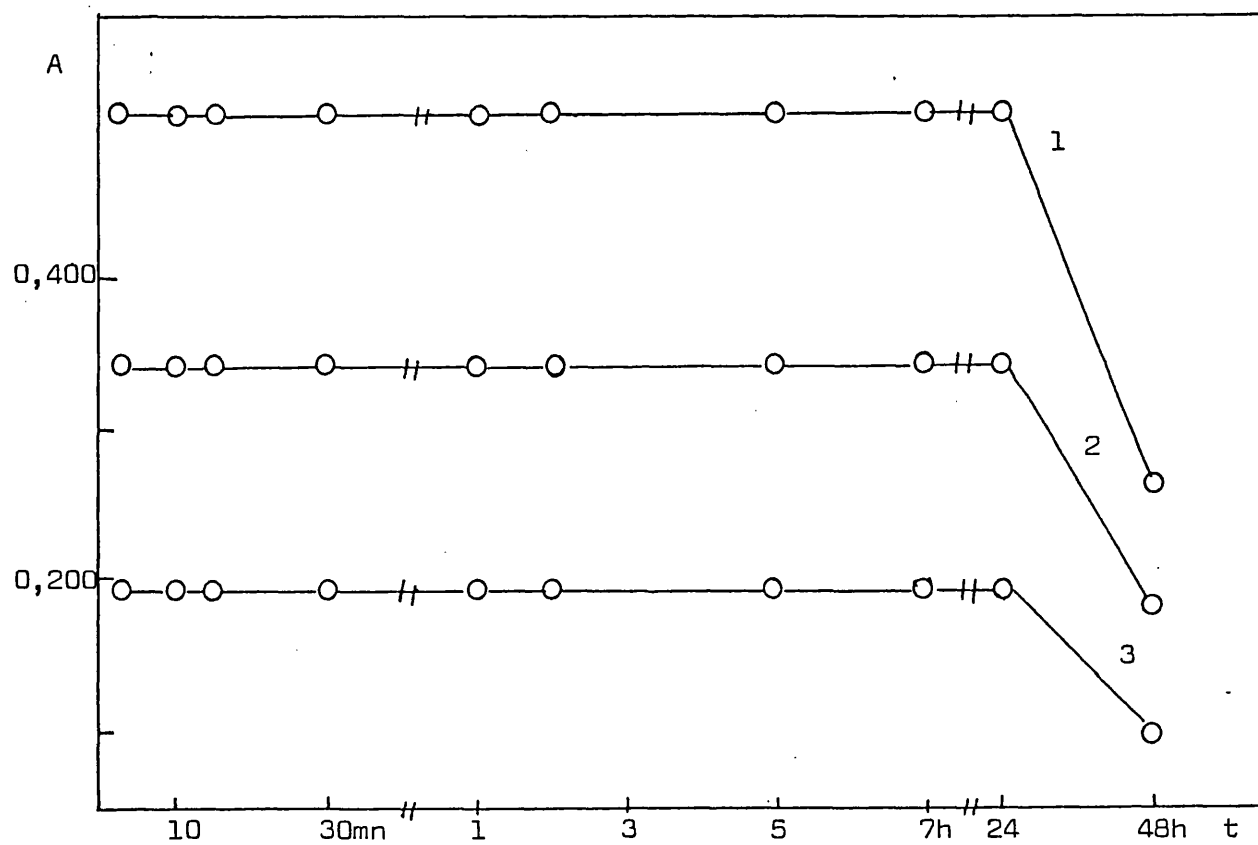


Figura 55.- Estabilidad de las disoluciones VB-Clorhexidina-triton X-100
 Concentración de clorhexidina: 1.- $2,64 \cdot 10^{-5}$ M; 2.- $2,06 \cdot 10^{-5}$ M ; 3.-
 $1,47 \cdot 10^{-5}$ M.

II.4.4.-NATURALEZA DEL SISTEMA VERDE DE BROMOCRESOL-
CLORHEXIDINA EN PRESENCIA DE TRITON X-100

Se realiza el estudio químico del sistema verde de bromocresol-clorhexidina con el fin de conocer la estequiometría del compuesto ó compuestos formados, así como las constantes condicionales de equilibrio.

Para ello se estudia el sistema en presencia y ausencia de agente tensioactivo y se aplican los métodos de las relaciones molares, determinación del número de especies absorbentes y método de Asmus.

1.- ESTEQUIOMETRIA DEL SISTEMA VERDE DE BROMOCRESOL-CLORHEXIDINA
EN AUSENCIA DE TRITON X-100.

Método

Se llevan a cabo medidas espectrofotométricas de la reacción entre el verde de bromocresol y la biguanida sin la presencia de agente tensioactivo, con el fin de obtener la estequiometría de la especie ó especies que se forman.

Para ello se mezclan 5 ml de verde de bromocresol $1,11 \cdot 10^{-4}$ M a pH 5,35 (tampón succínico-succinato), cantidades crecientes de clorhexidina $7,92 \cdot 10^{-4}$ M y los volúmenes correspondientes de agua desionizada hasta un volumen final de 10 ml, en tubos de centrifuga. Una vez centrifugado se extrae una alícuota del líquido sobrenadante y se lee su absorbancia a 615 nm frente a blanco agua desionizada, con el fin de evaluar el exceso de verde de bromocresol.

Se prepara otra serie en la que la clorhexidina se mantiene constante (5 ml de clorhexidina $2,23 \cdot 10^{-5}$ M, pH 5,35) y se adicio-

man cantidades de verde de bromocresol $3,63 \cdot 10^{-4}$ M, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo superior.

Resultados

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 86 y figura 56. Para ambas series se obtienen tres rectas que se cortan en los puntos correspondientes a una estequiometría 1:1 y 1:2 para el sistema sólido clorhexidina-verde de bromocresol.

1ª serie: concentración de clorhexidina variable

ml de clorh.	$C_{\text{Clorh.}} / C_{\text{Clorh.}} + C_{\text{V.B.}}$	$A_{615 \text{ nm}}$
0,00	0,00	2,000
0,12	0,15	1,410
0,14	0,17	1,310
0,20	0,22	1,240
0,26	0,28	1,130
0,36	0,34	1,056
0,40	0,36	0,840
0,46	0,40	0,710
0,56	0,44	0,397
0,70	0,50	0,181
0,92	0,57	0,046
1,40	0,67	0,034
2,80	0,80	0,023

2ª serie: concentración de verde de bromocresol variable

ml de V.B.	$C_{\text{V.B.}} / C_{\text{Clorh.}} + C_{\text{V.B.}}$	$A_{615 \text{ nm}}$
2,40	0,80	2,039
1,90	0,76	1,530
1,66	0,73	1,200
1,20	0,66	0,841
1,10	0,64	0,672
0,90	0,59	0,542
0,76	0,55	0,398
0,60	0,49	0,262
0,46	0,43	0,228
0,30	0,33	0,158
0,22	0,26	0,094
0,00	0,00	0,000

Tabla 86.- Estequiometría del sistema V.B.-Clorh. en ausencia de Triton X-100

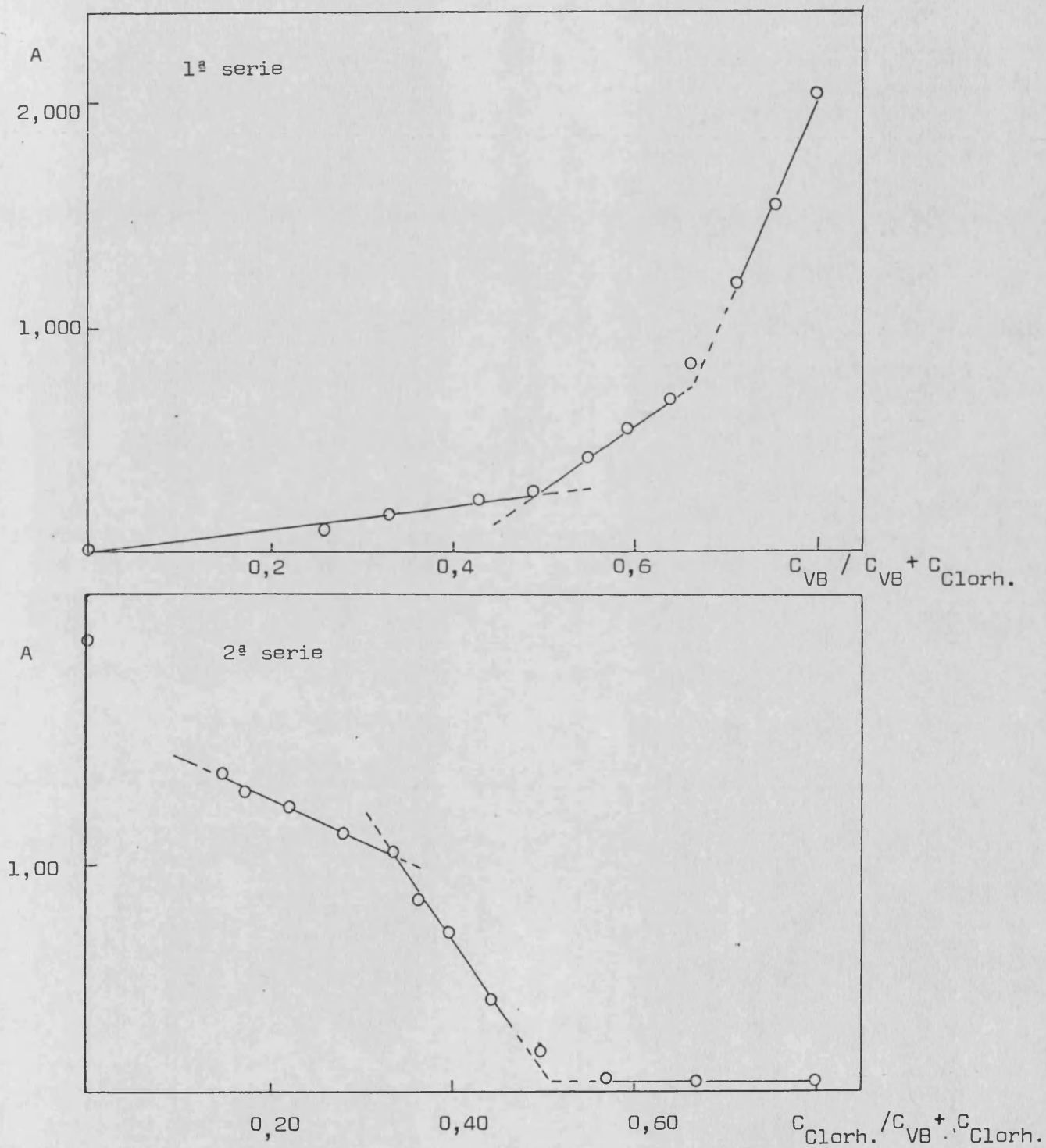


Figura 56.- Estequiometría del sistema V.B.-Clorhexidina en ausencia de triton X-100. (ver tabla 86).

2.- METODO DE LAS RELACIONES MOLARES (CURVAS DE SATURACION)

Con el fin de conocer la naturaleza del sistema verde de bromocresol-clorhexidina solubilizado por la presencia de triton X-100, se diseñan varias series de experiencias en las que se mantiene constante la concentración de uno de los reactivos y se varía la del otro de modo continuo.

a).- Variación de la concentración de verde de bromocresol

Método

Se preparan una serie de disoluciones en las que la concentración de biguanida se mantiene constante e igual a $2,06 \cdot 10^{-5}$ M, se añaden volúmenes crecientes de solución de verde de bromocresol $5,54 \cdot 10^{-4}$ M, 5 ml de la solución tampón succínico/succinato, 1 ml de triton X-100 2,5 % y se afora a 25 ml con agua desionizada. Como disoluciones de referencia en las medidas de absorbancia se utilizan disoluciones idénticas a las anteriores pero exentas de clorhexidina, registrándose los espectros en el intervalo de longitudes de onda que va de 500 a 700 nm.

Resultados y discusión

En la tabla 87 se muestran los valores de absorbancia obtenidos a 630 nm; los espectros correspondientes a las disoluciones preparadas se dan en la figura 57 no habiendo variación apreciable en la posición del máximo.

La representación de las lecturas anteriores frente a la relación $C_{V.B.}/C_{Clorh.}$ (figura 58) señala la estabilización de la absorbancia para relaciones molares superiores a 2,9, observándose que la intersección de las dos rectas tiene lugar en los valores próximos a 2.



$C_{VB}/C_{Clorh.}$	$A_{630\text{ nm}}$	$C_{VB}/C_{Clorh.}$	$A_{630\text{ nm}}$
0,30	0,052	1,90	0,239
0,50	0,080	2,11	0,258
0,70	0,102	2,32	0,271
0,90	0,140	2,48	0,283
1,08	0,157	2,69	0,293
1,29	0,183	2,91	0,327
1,51	0,205	3,01	0,329
1,72	0,223	3,23	0,329

Concentración de Clorh. $2,06 \cdot 10^{-5}$ M , Triton X-100 0,1 %.

Tabla 87.- Curva de saturación (variación de la concentración de verde de bromocresol).

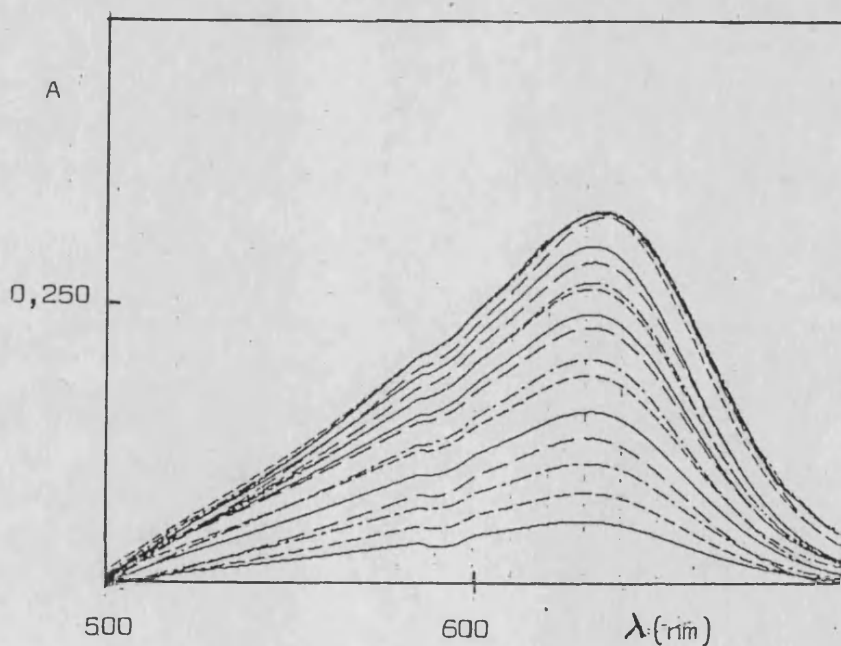


Figura 57.- Espectros correspondientes a las disoluciones de la tabla 87.

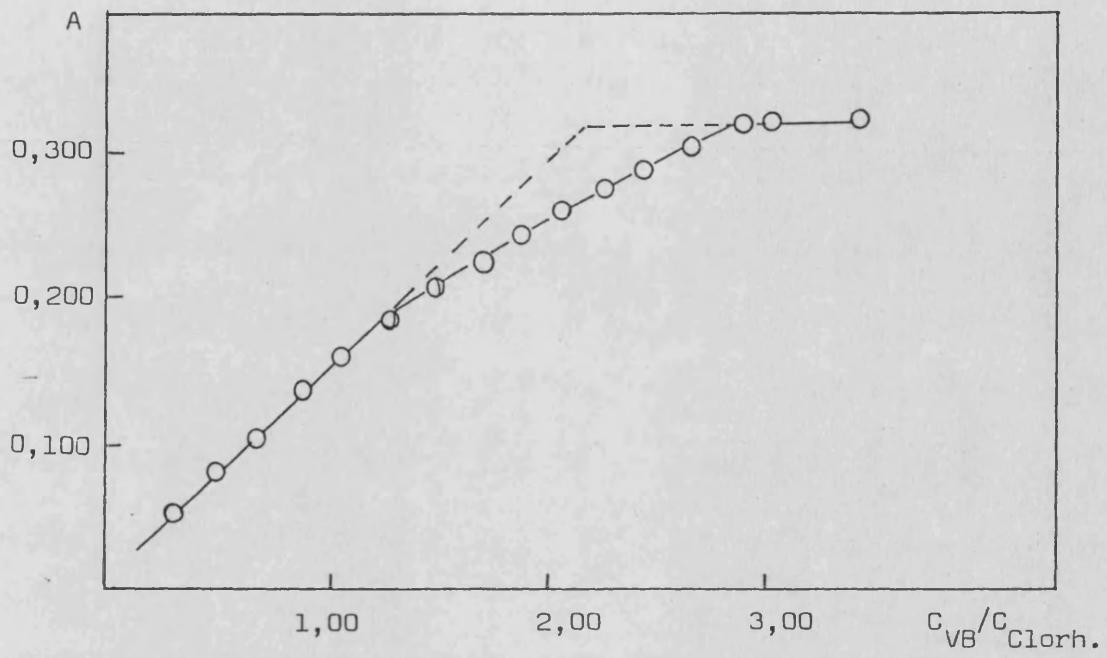


Figura 58.- Curva de saturación (variación de la concentración de verde de bromocresol).

b).- Variación de la concentración de Clorhexidina

Método

En matraces aforados de 25 ml se preparan disoluciones tomando 3,7 ml de verde de bromocresol $5,54 \cdot 10^{-4}$ M, volúmenes crecientes de solución de clorhexidina $3,67 \cdot 10^{-4}$ M, 5 ml de la solución tampón y 1 ml de triton X-100 2,5 %.

Como "blanco" para las medidas de absorbancia se toma una disolución constituida por reactivo, tampón y triton X-100 en las mismas proporciones que las muestras.

Los resultados obtenidos aconsejaron la realización de otras dos experiencias: en una se aumentó la concentración de tensioactivo a 0,2% y en la segunda se disminuyó el verde de bromocresol a $2,21 \cdot 10^{-5}$ M.

Resultados y discusión

Los espectros correspondientes a las tres experiencias realizas se dan en las figuras 59, 60 y 61 y los valores de absorbancia respectivos a 630 nm aparecen en la tabla 88, dichas lecturas representadas frente a la razón molar $C_{\text{Clorh.}} / C_{\text{V.B.}}$ aparecen en la figura 62.

Las disoluciones con relaciones molares $C_{\text{Clorh.}} / C_{\text{V.B.}}$ superiores a 0,49 correspondientes a la primera serie realizada presentaron turbidez, por lo que solo se observa una línea recta (figura 62) cuyo ajuste da la ecuación $A = -0,06 + 16976 C$ ($r=0,999$).

A la vista de estos resultados se realizó la segunda experiencia obteniéndose una curva de saturación sensiblemente distinta a la correspondiente al apartado anterior, no llegándose a saturar el sistema verde de bromocresol-clorhexidina aún a valores

$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}} = 8,2$. Por lo que en principio se puede pensar que corresponde a una nueva asociación de estabilidad baja.

La tercera serie realizada (curva III, figura 62) muestra que dicha asociación no alcanza valores constantes de absorbancia en el rango de relaciones molares que va de 0,67 a 20,94.

Curva I: concentración de V.B. $5,98 \cdot 10^{-5}$ M y de tritron X-100 0,1%

$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}}$	$A_{630 \text{ nm}}$	$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}}$	$A_{630 \text{ nm}}$
0,10	0,071	0,35	0,303
0,15	0,101	0,40	0,347
0,20	0,143	0,45	0,411
0,25	0,185	0,49	0,463
0,30	0,238	0,61	turbidez

Curva II: concentración de V.B. $5,54 \cdot 10^{-5}$ M y de tritron X-100 0,2%

$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}}$	$A_{630 \text{ nm}}$	$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}}$	$A_{630 \text{ nm}}$
0,27	0,127	1,73	0,671
0,40	0,192	2,01	0,732
0,53	0,248	2,68	0,860
0,67	0,311	4,02	1,031
0,94	0,431	5,36	1,137
1,23	0,514	8,37	1,262
1,48	0,589		

Curva III: concentración de V.B. $2,21 \cdot 10^{-5}$ M y de tritron X-100 0,1%

$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}}$	$A_{630 \text{ nm}}$	$C_{\text{Clorh.}}/C_{\text{V.B.}}$	$A_{630 \text{ nm}}$
0,67	0,093	4,33	0,366
1,00	0,141	5,03	0,384
1,34	0,174	6,70	0,416
1,68	0,208	10,05	0,469
2,35	0,268	13,40	0,493
3,07	0,303	20,94	0,530
3,70	0,339		

Tabla 88.- Curvas de saturación (variación de la concentración de clorhexidina)

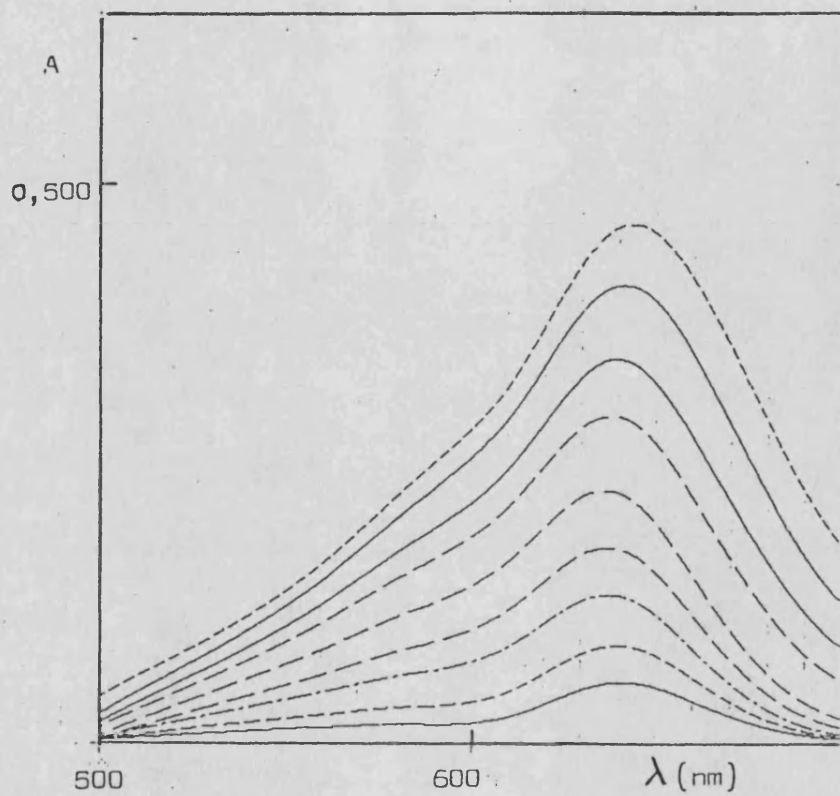


Figura 59.- Espectros correspondientes a las disoluciones de la 1ª serie de la tabla 88.

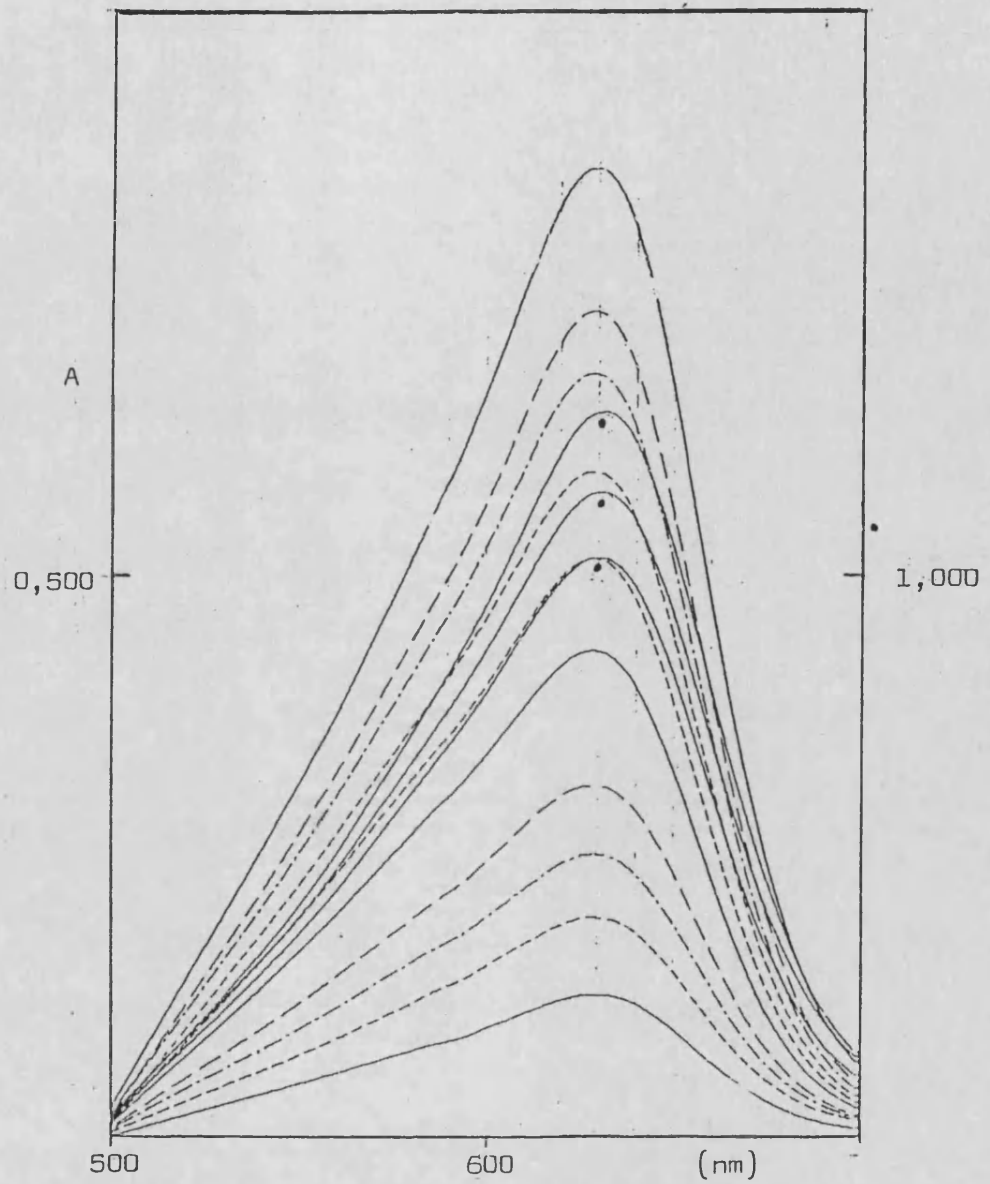


Figura 60.- Espectros correspondientes a las disoluciones de la 2ª serie de la tabla 88.

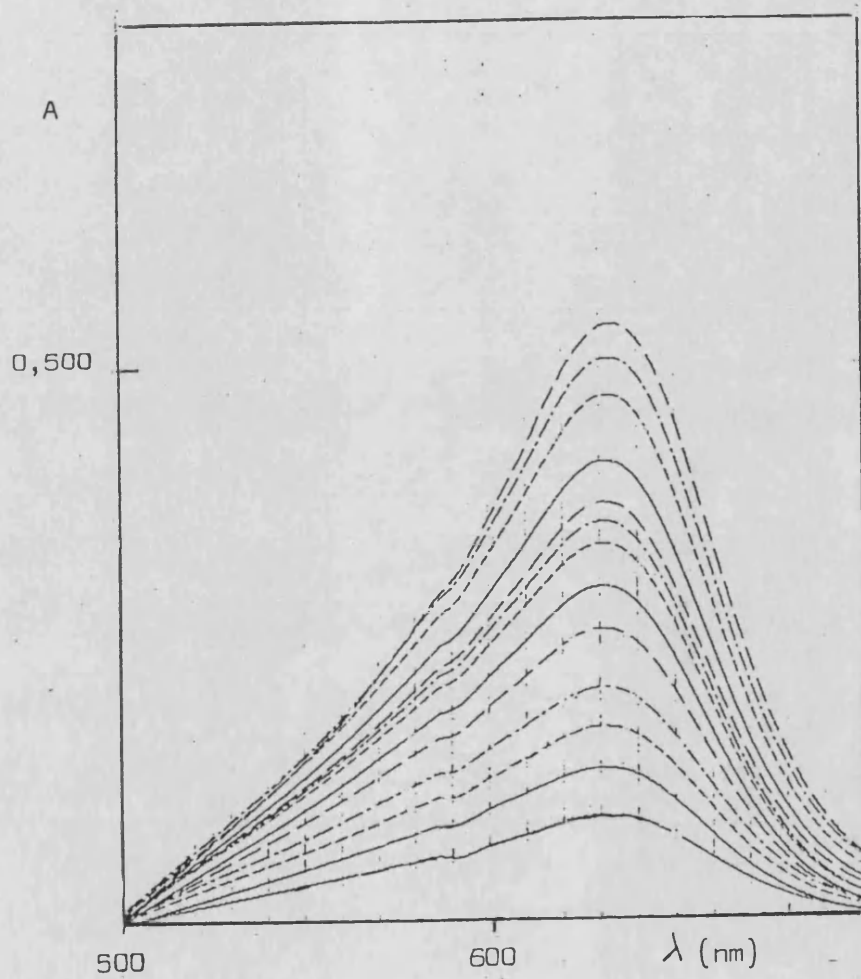


Figura 61.- Espectros correspondientes a las disoluciones de la 3ª serie de la tabla 88.

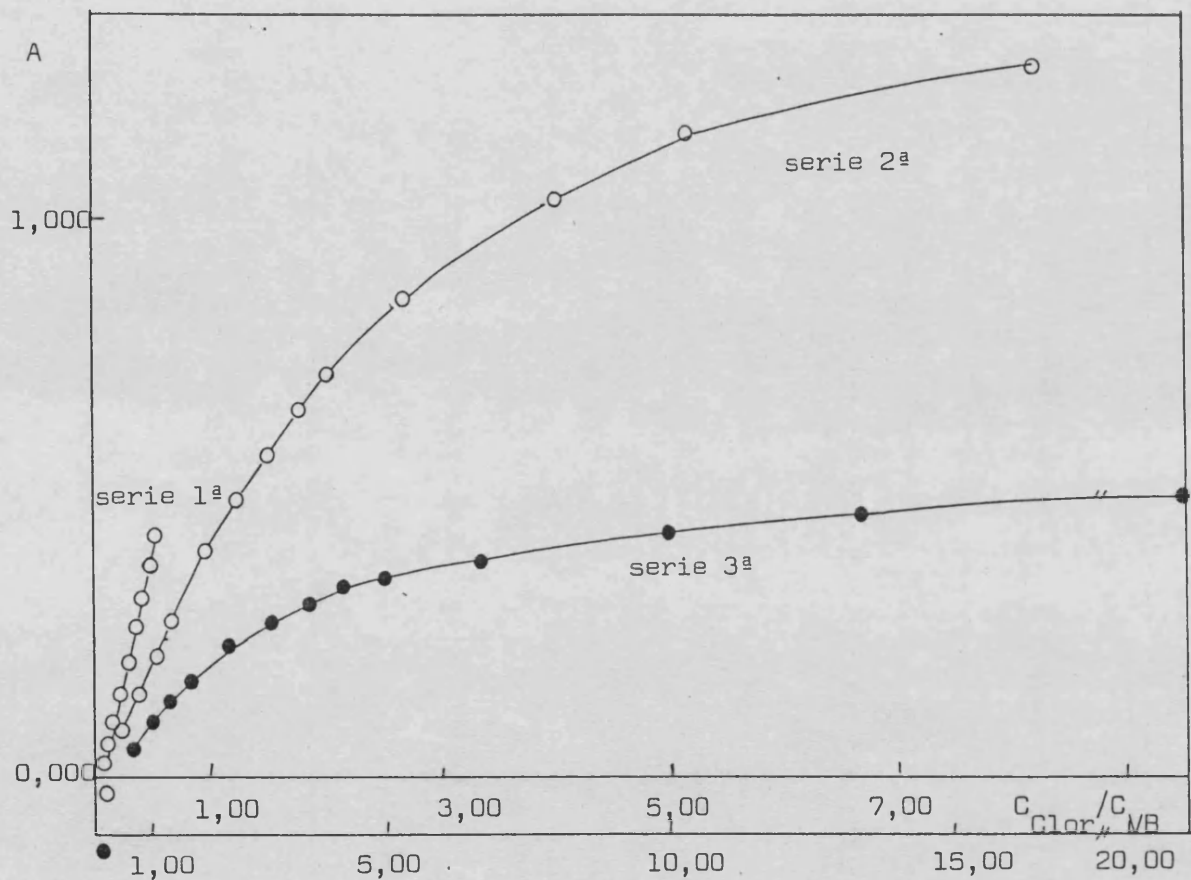


Figura 52.- Curvas de saturación (variación de la concentración de clorhexidina (ver tabla 88).

3.- DETERMINACION DEL NUMERO DE ESPECIES ABSORBENTES

Fundamentos

Con el fin de determinar el número de especies que absorben en la zona de longitudes de onda de interés, se aplica el método de Coleman, Varga y Mastin (187) a los datos experimentales obtenidos y cuyo fundamento, se basa, en el hecho de que si se desarrolla el espectro de absorción de una serie de disoluciones en las que se varía regularmente la concentración de uno de los reactivos, se obtienen un conjunto de datos de absorbancia A_{ij} (los subíndices i indican la longitud de onda y j la composición de la disolución). Con estos datos podemos construir una matriz de absorción $\|A_{ij}\|$.

$$\begin{vmatrix} A_{11} & A_{12} & \dots\dots\dots & A_{1j} \\ A_{21} & A_{22} & \dots\dots\dots & A_{2j} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ A_{i1} & A_{i2} & \dots\dots\dots & A_{ij} \end{vmatrix}$$

El rango de una matriz nos da el número de elementos linealmente independientes de la misma, que para una matriz de absorción coincide con el número de especies absorbentes en la disolución.

Si la matriz es de rango R , deben hacerse igual a cero todos los determinantes de orden $R + 1$.

Si solo existe una especie absorbente, $R=1$ y por tanto:

$$\begin{vmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{vmatrix} = 0$$

$$A_{11} \cdot A_{22} = A_{21} \cdot A_{12}$$

$$\frac{A_{11}}{A_{21}} = \frac{A_{12}}{A_{22}} = \frac{A_{1j}}{A_{2j}} = \frac{x}{y}$$

Representando los puntos (x,y) de coordenadas (A_{ij}, A_{i'j}) debe obtenerse una línea recta que pase por el origen.

Si R=2, el determinante:

$$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 \\ A_{21}/A_{11} & A_{22}/A_{12} & A_{23}/A_{13} \\ A_{31}/A_{11} & A_{32}/A_{12} & A_{33}/A_{13} \end{vmatrix} = 0$$

lo que se cumple cuando:

$$\frac{A_{21}/A_{11}}{A_{31}/A_{11}} = \frac{A_{22}/A_{12}}{A_{32}/A_{12}} = \frac{A_{23}/A_{13}}{A_{33}/A_{13}} = \frac{x}{y}$$

Dicha ecuación restringe los puntos (x,y) de coordenadas (A_{ij}/A_{i'j}, A_{i''j}/A_{i'j}) a una línea recta. Por lo tanto, una representación gráfica de las absorbancias a tres longitudes de onda distintas, proporciona un test para conocer si una serie de espectros puede describirse en términos de dos especies absorbentes.

Si R=3 la aplicación del método es más compleja.

Sin embargo, si la suma de las concentraciones de las es-

pecies absorbentes en solución se mantiene constante se simplifica el método. Esta situación se da cuando se trata de complejos metálicos ML_n y en la serie de disoluciones se varía la concentración de ligando, manteniéndose constante la de metal, cumpliéndose la relación:

$$\sum_{n=0}^N (ML_n) = \text{cte}$$

Así, para el caso de dos especies absorbentes y en el supuesto anterior, el rango de la matriz $\|A_{ij} - A_{ij'}\|$ es la unidad, por lo que representando $(A_{ij} - A_{ij'})$ a la longitud de onda i , frente a la diferencia $(A_{i'j} - A_{i'j'})$ a otra longitud de onda i' , se obtendrá una línea recta que pase por el origen.

Del mismo modo, para tres especies absorbentes, el rango de la matriz $\|A_{ij} - A_{ij'}\|$ se reduce a dos, siendo entonces la situación análoga a la descrita para dos especies absorbentes con estequiometría no constante. Así, la representación de $(A_{ij} - A_{ij'}) / (A_{i'j} - A_{i'j'})$ frente a $(A_{i''j} - A_{i''j'}) / (A_{i'j} - A_{i'j'})$ deberá ser una línea recta.

Método

Se utilizan los valores experimentales de las series de disoluciones preparadas y estudiadas en anteriores apartados clasificadas en dos grupos:

a).- Variación de la concentración de verde de bromocresol

$$\text{Intervalo estudiado } 1,29 \leq C_{V.C.} / C_{Clorh.} \leq 2,90$$

b).- Variación de la concentración de clorhexidina (3ª serie)

$$\text{Intervalo estudiado } 0,67 \leq C_{Clorh.} / C_{V.B.} \leq 10,01$$

Las absorbancias utilizadas se registraron en el intervalo 550-670 nm cada 10 nm.

Resultados y discusión

Los valores de absorbancia a cada longitud de onda de las disoluciones preparadas se dan en las tablas 89 y 90.

Al representar A_{ij} frente a A_{630j} tanto para la serie a) como para la b) (figuras 63 y 64), se obtienen líneas rectas que pasan por el origen de coordenadas, por lo que en todas las condiciones de trabajo estudiadas únicamente hay una especie absorbente.

λ (nm)	Absorbancia 630 nm								
	$C_{VB} / C_{Clorh.}$	1,29	1,51	1,72	1,90	2,11	2,32	2,48	2,91
550		0,064	0,072	0,078	0,086	0,088	0,094	0,094	0,109
560		0,077	0,088	0,094	0,102	0,107	0,114	0,114	0,132
570		0,092	0,104	0,112	0,120	0,128	0,135	0,137	0,158
580		0,107	0,120	0,130	0,139	0,148	0,156	0,160	0,185
590		0,117	0,132	0,142	0,153	0,164	0,172	0,178	0,207
600		0,135	0,151	0,163	0,175	0,188	0,197	0,204	0,237
610		0,153	0,171	0,186	0,199	0,214	0,224	0,233	0,269
620		0,172	0,192	0,209	0,223	0,241	0,252	0,262	0,302
630		0,183	0,205	0,223	0,239	0,258	0,271	0,283	0,327
640		0,176	0,198	0,215	0,231	0,249	0,263	0,277	0,322
650		0,148	0,166	0,182	0,196	0,211	0,224	0,237	0,281
660		0,107	0,122	0,134	0,145	0,155	0,166	0,179	0,218
670		0,069	0,079	0,087	0,095	0,101	0,110	0,119	0,151

Tabla 89.- Determinación del número de especies absorbentes (serie: variación del verde de bromocresol).

(nm)	Absorbancia 630 nm											
	$C_{\text{Clorh.}} / C_{\text{VB}}$	0,67	1,01	1,34	1,68	2,35	3,07	3,70	4,33	5,03	6,70	10,05
550		0,031	0,046	0,058	0,059	0,091	0,098	0,109	0,121	0,127	0,131	0,140
560		0,038	0,057	0,071	0,085	0,110	0,121	0,134	0,147	0,154	0,160	0,173
570		0,046	0,068	0,084	0,101	0,131	0,145	0,161	0,175	0,183	0,192	0,209
580		0,054	0,080	0,098	0,118	0,152	0,170	0,188	0,205	0,214	0,226	0,247
590		0,059	0,088	0,109	0,131	0,170	0,191	0,213	0,232	0,242	0,257	0,283
600		0,067	0,102	0,125	0,151	0,195	0,219	0,244	0,265	0,276	0,295	0,328
610		0,078	0,117	0,144	0,173	0,223	0,252	0,280	0,303	0,316	0,339	0,379
620		0,087	0,132	0,162	0,195	0,251	0,284	0,316	0,342	0,358	0,386	0,433
630		0,093	0,141	0,174	0,208	0,268	0,303	0,339	0,365	0,384	0,416	0,469
640		0,089	0,135	0,167	0,200	0,258	0,291	0,326	0,353	0,372	0,404	0,458
650		0,073	0,112	0,139	0,166	0,216	0,244	0,274	0,298	0,317	0,344	0,393
660		0,052	0,080	0,100	0,120	0,158	0,177	0,201	0,220	0,237	0,259	0,297
670		0,031	0,049	0,063	0,076	0,101	0,112	0,129	0,144	0,158	0,173	0,201

Figura 90.- Determinación del número de especies absorbentes (serie: variación de la clorhexidina).

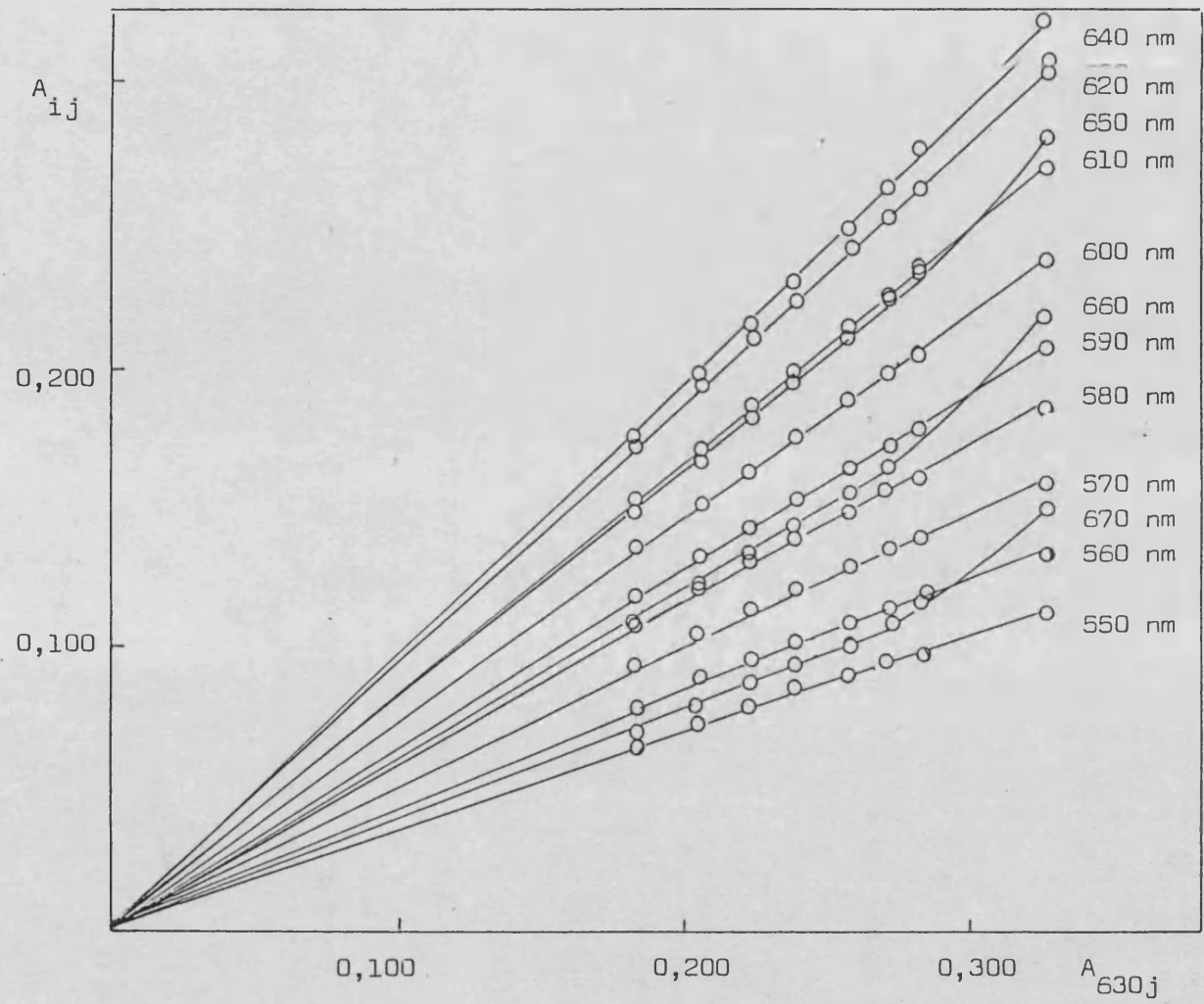


Figura 63.- Determinación del número de especies absorbentes (serie variación del verde de bromocresol).

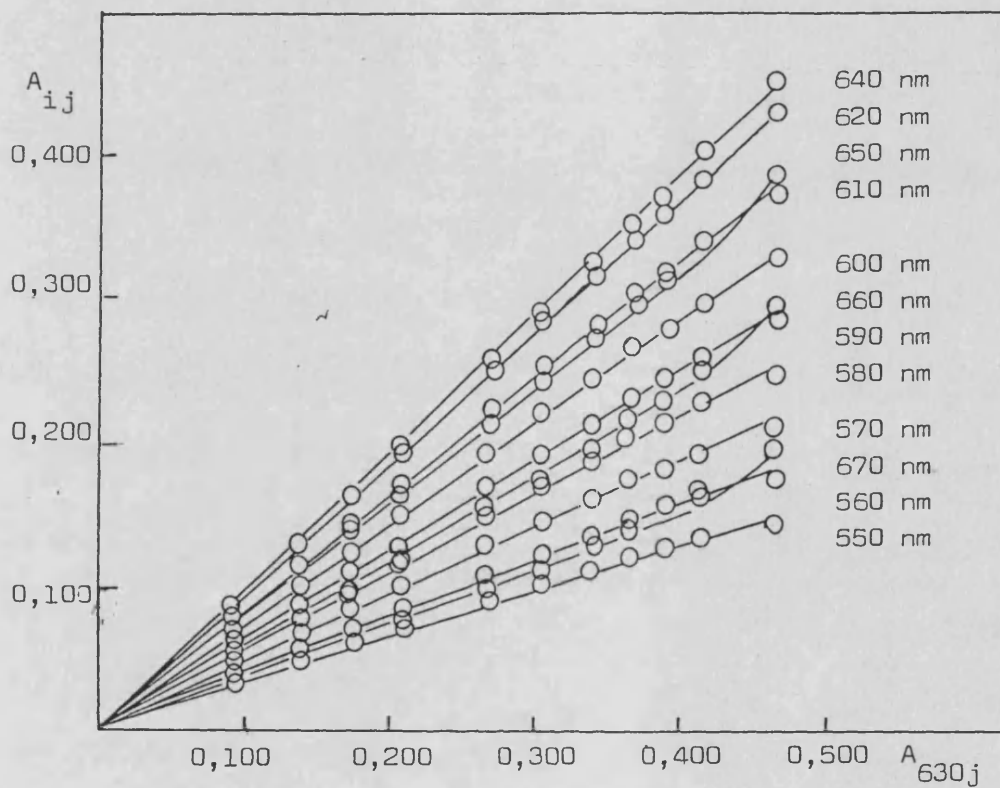


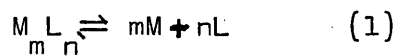
Figura 64.- Determinación del número de especies absorbentes (serie variación de la clorhexidina).

4.- METODO DE ASMUS

Con el fin de determinar la estequiometría del sistema verde de bromocresol-clorhexidina en presencia de triton X-100 se procede a la aplicación del método de Asmus (188).

El método de Asmus, llamado de la línea recta, fue utilizado en principio para complejos del tipo ML_n y, posteriormente ampliado por K.S. Klausen y F.J. Langmyrh (189) para complejos del tipo M_mL_n .

Así para el equilibrio



dónde

$$K = \frac{|M|^m |L|^n}{|M_mL_n|} \quad (2)$$

La ecuación de Asmus toma la forma:

$$\frac{1}{v^n} = \left(\frac{a_0 v_0}{V}\right)^m \left(\frac{b_0}{V}\right)^n \frac{E_d}{K} \frac{1}{Z} - \frac{m^2}{K} \left(\frac{a_0 v_0}{V}\right)^{m-1} \left(\frac{b_0}{V}\right)^n \quad (3)$$

siendo:

a_0 y b_0 las disoluciones iniciales de las disoluciones de M y L, respectivamente.

v_0 volumen constante tomado de M

v volumen variable de L

V volumen total de la disolución final

E_d coeficiente de absortividad molar del complejo M_mL_n

Z cociente A/d, módulo de la extinción molar suponiendo M_mL_n la única especie que absorbe.

Al representar los valores $1/v^n$ frente a $1/Z$ de una serie en la que se ha mantenido constante la concentración de M, cuando el valor de "n" coincida con el coeficiente estequiométrico del complejo, la ecuación (3) corresponderá a la de una recta.

Para el coeficiente "m" se realiza una serie en la que la concentración de L se mantiene constante, tomando la ecuación de Asmus la forma:

$$\frac{1}{v^m} = \left(\frac{b_o v_o}{V}\right)^n \left(\frac{a_o}{V}\right) \frac{E_d}{K} \frac{1}{Z} - \left(\frac{b_o v_o}{V}\right)^{n-1} \left(\frac{a_o}{V}\right)^m \frac{n^2}{K} \quad (4)$$

Por último cabe decir, que se considera en principio apropiada la elección de dicho método por dar buenos resultados en el caso de sistemas de estabilidad media, no precisándose el conocimiento de la concentración de las disoluciones de partida. Es también apropiado dado que se precisa la presencia de una sola especie absorbente, condición que en el apartado anterior se ha puesto de manifiesto para las zonas correspondientes a:

$$1,51 \leq C_{VB} / C_{Clorh.} \leq 2,91 \quad (\text{variación verde de bromocresol})$$

$$0,67 \leq C_{Clorh.} / C_{VB} \leq 10,50 \quad (\text{variación de clorhexidina})$$

Método

Se preparan dos series de experiencias con el fin de determinar la estequiometría de los sistemas verde de bromocresol-clorhexidina solubilizados en triton X-100, correspondientes a los intervalos señalados anteriormente en los que únicamente absorbe una especie.

1ª serie

A disoluciones en las que la concentración de clorhexidina se mantiene constante (1,40 ml de $3,67 \cdot 10^{-4}$ M) se adicionan, en este orden, cantidades crecientes de verde de bromocresol $9,42 \cdot 10^{-4}$ M de manera que la relación de concentraciones $C_{VB}/C_{Clorh.}$ sea mayor a 1,50, 5 ml de tampón, 1 ml de triton X-100 2,5 % y se afora a 25 ml. Del mismo modo, se preparan disoluciones que mantienen constante la concentración de verde de bromocresol (3,80 ml de $5,54 \cdot 10^{-4}$ M) y variable la de clorhexidina $3,09 \cdot 10^{-4}$ M.

2ª serie

Se procede del mismo modo que en la 1ª serie, salvo que la relación de concentraciones $C_{VB}/C_{Clorh.}$ es inferior a 1,50.

En las disoluciones en las que la concentración de clorhexidina se mantiene constante (1,40 ml de $3,67 \cdot 10^{-4}$ M), la solución madre de verde de bromocresol utilizada es $2,77 \cdot 10^{-4}$ M y en las que la concentración de reactivo es constante (1 ml de $5,54 \cdot 10^{-4}$ M) la de biguanida empleada es $2,16 \cdot 10^{-3}$ M.

Las disoluciones "blancos" correspondientes se preparan del modo habitual.

Resultados y discusión

Se presentan los resultados obtenidos en la tabla 91 y en las figuras 65 y 66.

En la primera serie se obtienen sendas rectas para una estequiometría clorhexidina:verde de bromocresol (1:2) y en la segunda para una (1:1). Se deduce la predominancia de uno u otro

compuesto en función de la relación de concentraciones relativa.

A partir de la ordenada en el origen de la recta de Asmus para la variación del verde de bromocresol (1ª serie), se obtiene un valor para la constante condicional del sistema 1:2 de:

$$\frac{-1}{K} \left(\frac{b_o}{V} \right)^2 = -1,625 \quad ; \quad K = 8,7 \cdot 10^{-10}$$

Así mismo, de la pendiente de la recta:

$$\left(\frac{a_o v_o}{V} \right) \left(\frac{b_o}{V} \right)^2 \frac{E_d}{K} = 0,613$$

$E_d = 18.300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (valor similar al obtenido para la pendiente de la 1ª serie, correspondiente a la curva de saturación en la que se varía la clorhexidina).

Para el sistema 1:1 teniendo en cuenta la recta de Asmus para la variación de la clorhexidina (2ª serie) los valores correspondientes son:

$$-\left(\frac{a_o}{V} \right) \frac{1}{K} = -1,374 \quad ; \quad K = 6,3 \cdot 10^{-5}$$

$$\left(\frac{b_o v_o}{V} \right) \left(\frac{a_o}{V} \right) \frac{E_d}{K} = 0,819 \quad ; \quad E_d = 26.900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

La recta de Asmus correspondiente a la variación de reactivo conduce a valores similares.

Los resultados que se dan estan de acuerdo con las curvas de saturación obtenidas para el sistema verde de bromocresol-clorhexidina (figuras 58 y 62) que se dan en el apartado anterior de esta memoria.

1ª serie

$C_{VB}/C_{Clorh.}$	v(ml)	A	1/A	1/v	1/v ²	1/v ³
1,722	0,94	0,223	4,48	1,06	1,13	1,20
1,900	1,04	0,239	4,18	0,96	0,92	0,89
2,111	1,15	0,258	3,88	0,87	0,76	0,66
2,322	1,26	0,271	3,69	0,79	0,63	0,50
2,488	1,35	0,283	3,53	0,74	0,55	0,41
2,699	1,47	0,293	3,41	0,68	0,46	0,32

$C_{Clorh.}_0 = 3,67 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $v_0 = 1,4 \text{ ml}$; $VB_0 = 9,42 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

$C_{Clorh.}/C_{VB}$	v(ml)	A	1/A	1/v	1/v ²	1/v ³
0,155	1,00	0,138	7,25	1,00	1,00	1,00
0,188	1,25	0,178	5,62	0,80	0,64	0,51
0,222	1,50	0,222	4,50	0,67	0,44	0,30
0,266	1,75	0,264	3,79	0,57	0,33	0,19
0,29	2,00	0,305	3,28	0,50	0,25	0,13
0,333	2,25	0,352	2,84	0,44	0,20	0,09
0,377	2,50	0,405	2,47	0,40	0,16	0,06
0,410	2,75	0,450	2,22	0,36	0,13	0,05

$VB_0 = 5,54 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $v_0 = 3,8 \text{ ml}$; $C_{Clorh.}_0 = 3,09 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

2ª serie

$C_{VB}/C_{Clorh.}$	v(ml)	A	1/A	1/v	1/v ²	1/v ³
0,310	0,56	0,052	19,2	1,79	3,20	5,70
0,560	0,92	0,080	12,5	1,09	1,18	1,28
0,910	1,68	0,140	7,14	0,60	0,35	0,21
1,088	2,00	0,157	6,37	0,50	0,25	0,13
1,299	2,40	0,183	5,46	0,42	0,17	0,07
1,511	2,80	0,205	4,88	0,36	0,13	0,05

$C_{Clorh.}_0 = 3,67 \cdot 10^{-4}$, $v_0 = 1,4 \text{ ml}$; $VB_0 = 2,77 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

$C_{Clorh.}/C_{VB}$	v(ml)	A	1/A	1/v	1/v ²	1/v ³
3,770	0,95	0,339	2,95	1,05	1,11	1,17
4,333	1,15	0,366	2,73	0,87	0,76	0,66
5,033	1,33	0,384	2,60	0,75	0,57	0,43
6,770	1,78	0,416	2,40	0,57	0,32	0,18
10,035	2,67	0,469	2,13	0,37	0,14	0,05
13,440	3,56	0,498	2,01	0,28	0,08	0,02
20,994	5,56	0,530	1,89	0,18	0,03	0,006

$VB_0 = 5,54 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $v_0 = 1 \text{ ml}$; $C_{Clorh.}_0 = 2,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Tabla 91.- Método de Asmus.

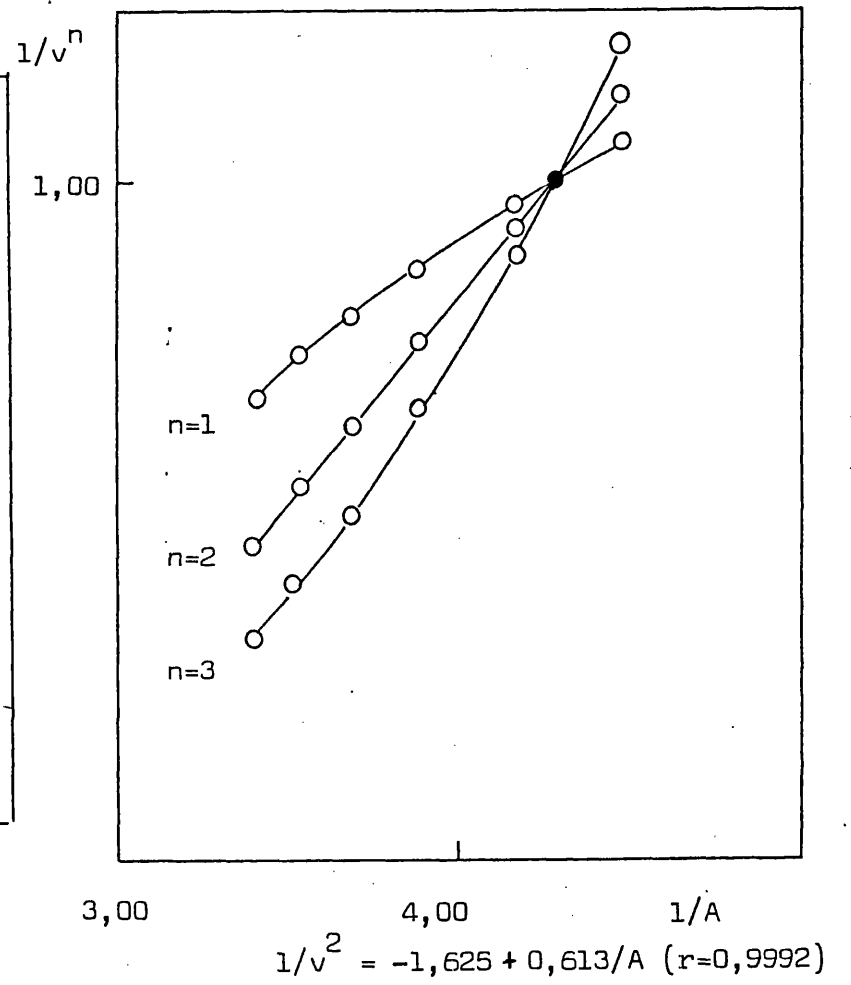
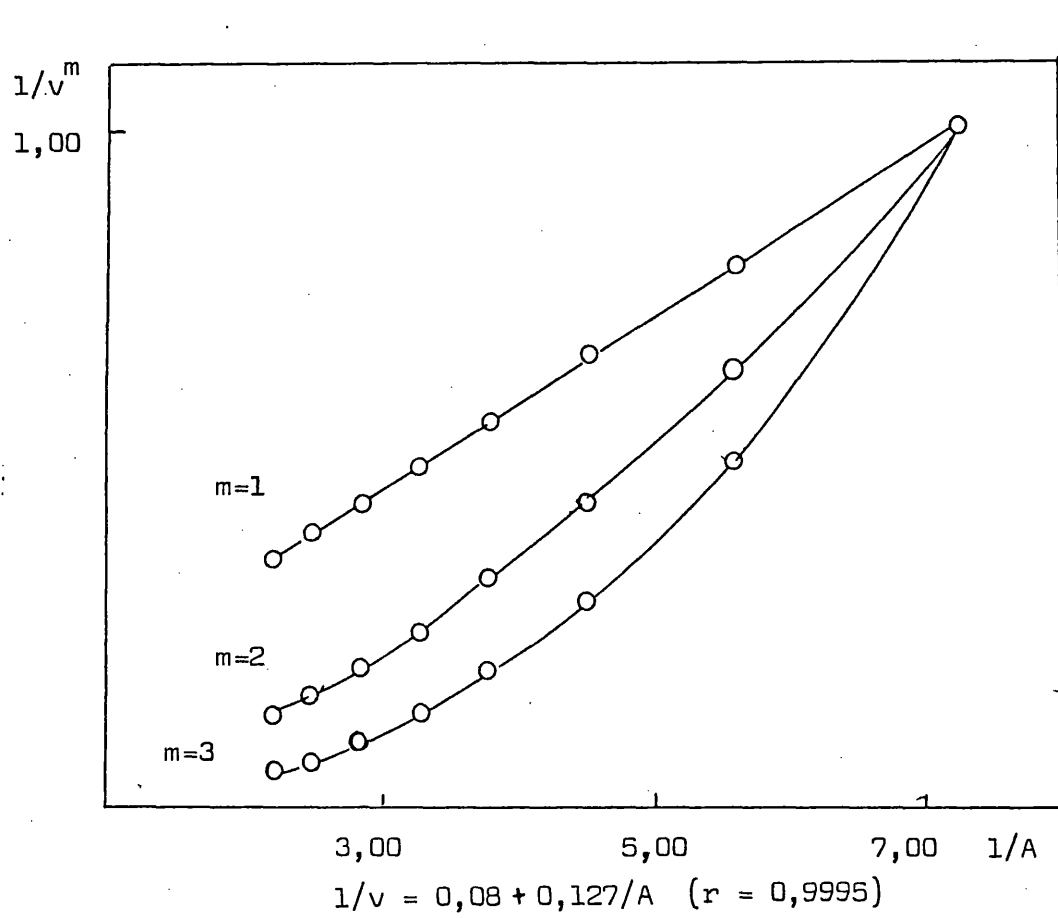


Figura 65.- Método de Asmus (1ª serie tabla 91)

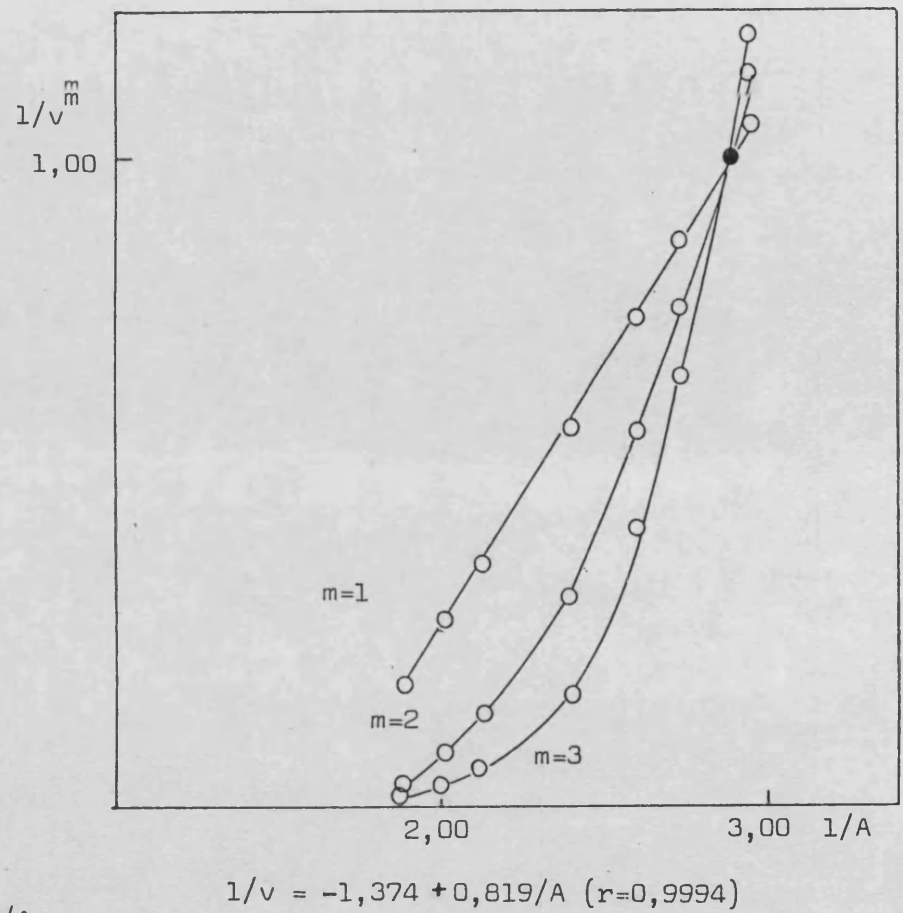
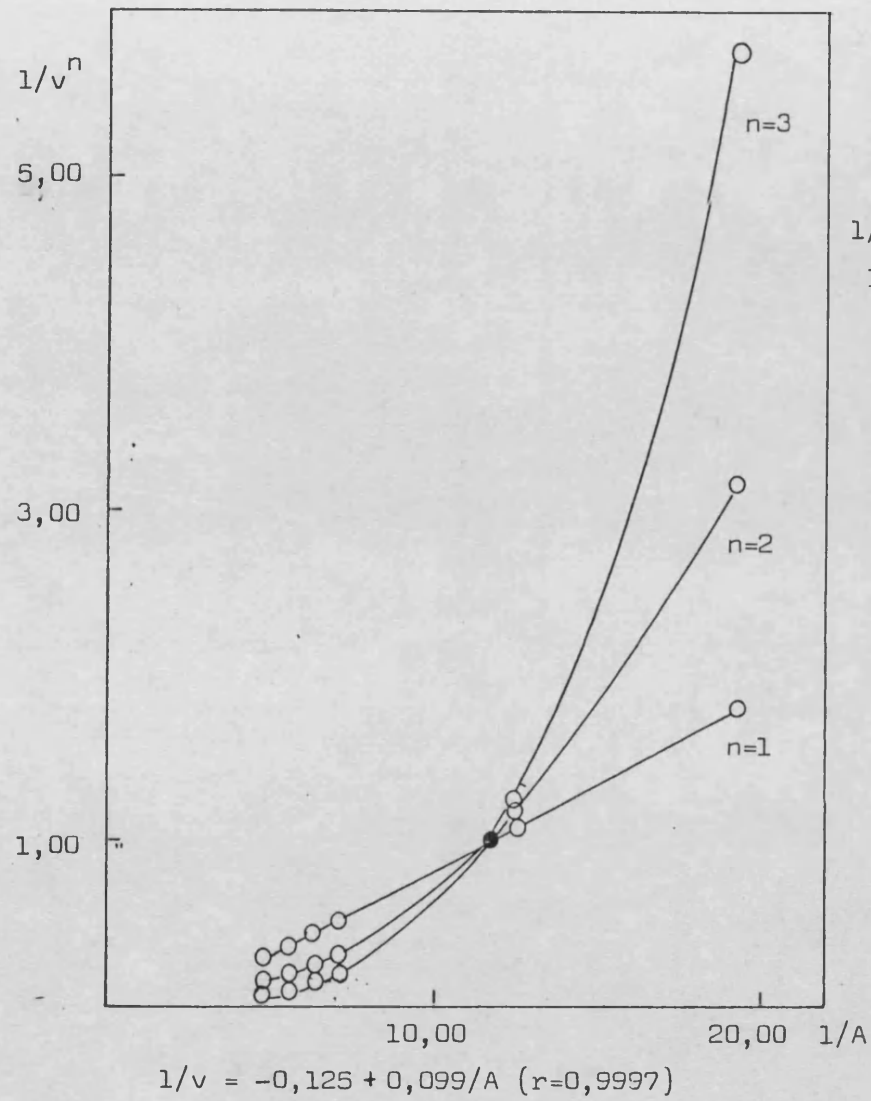


Figura 66.- Método de Asmus (2ª serie tabla 91).

5.- DISCUSION

Se estudia la naturaleza del sistema verde de bromocresol-clorhexidina y se observa la formación de dos compuestos diferentes, con abscisas 0,5 y 0,66 en la representación $A = f\left(\frac{C_{VB}}{C_{VB} + C_{Clorh}}\right)$ y 0,33 - 0,5 en el diagrama $A = f\left(\frac{C_{Clorh}}{C_{Clorh} + C_{VB}}\right)$.

No se extrae información definitiva sobre la naturaleza del sistema en presencia de triton X-100 al aplicar el método de las relaciones molares. De la curva de saturación donde se varía la concentración de verde de bromocresol se deduce la existencia de un compuesto de estequiometría 1:2 (Clorh : V B) que alcanza la saturación a relaciones molares $\frac{C_{VB}}{C_{Clorh}} = 2,9$. Las curvas de saturación obtenidas al variar la biguanida parecen indicar la existencia de otra especie de estabilidad menor.

La aplicación del método de Asmus (adecuado para compuestos de estabilidad media) previa determinación del número de especies absorbentes, establece la existencia de ambas asociaciones con estequiometrías 1:2 y 1:1. Además permite calcular los valores de las constantes de estabilidad, siendo respectivamente $8,7 \cdot 10^{-10}$ y $6,3 \cdot 10^{-5}$, que justifican las curvas de saturación obtenidas.

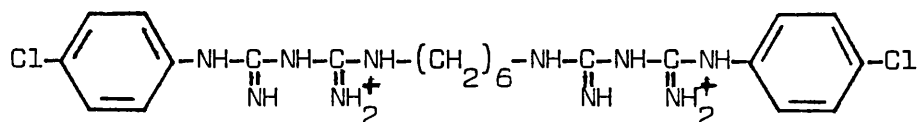
La existencia de ambas especies y el estrecho margen de pH necesario para su obtención implican que el V B se encontrará en forma monoaniónica (pK 4,66) y la clorhexidina diprotonada (un proton por cada grupo biguanida; pKa1= 2,3 y pKa2= 10,4).

La formación del compuesto 1:1 requiere la presencia de otro anión. Los ensayos cualitativos realizados sobre los precipitados

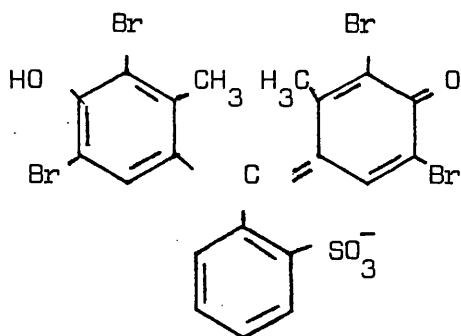
(ausencia de triton X-100) lavados unas 10 veces y redisolu-
tos en medio HNO_3 , indican la existencia de iones Cl^- (reac-
ción positiva con AgNO_3) en el caso de la especie 1:1 y su
ausencia en la 1:2.

Por tanto los compuestos de asociación iónica en cues-
tión son : $(\text{BigH}_2)^{2+} (\text{VB})^- \text{Cl}^-$ y $(\text{BigH}_2)^{2+} (\text{VB}^-)_2$.

siendo BigH_2^{2+}



y VB^-



II.4.5.- DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE CLORHEXIDINA

Se procede a aplicar los resultados espectrofotométricos obtenidos a la determinación de clorhexidina en preparados farmacéuticos. Dicha aplicación se realiza en dos modalidades diferentes:

- a).- Determinación espectrofotométrica directa (método convencional) .
- b).- Determinación espectrofotométrica con las técnicas del Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

En el primer caso se estudia el cumplimiento de la ley de Beer especificando el intervalo óptimo de aplicación; la reproducibilidad de la determinación; especies potencialmente interferentes, y por último, se determina la clorhexidina contenida en el medicamento conocido como Hibitane 5 %.

El apartado b) incluye además de lo expuesto para el a), el estudio y optimización previas de todas las variables FIA disponibles: velocidad de flujo, longitud del reactor y volumen de muestra. También requiere el repaso de la optimización de las variables químicas del proceso: pH y concentración de reactivos.

El estado actual de la determinación se concreta diciendo que es un proceso extracto-colorimétrico, con cloroformo como fase apolar. La absorptividad molar es 11,100 (longitud de onda 4110 nm, pH 5,70), permite la detección de clorhexidina de 2,5 a 30 $\mu\text{g/ml}$ con $E_r = 3,8 \%$ y $\text{dsr} = 2,4 \%$. Con este procedimiento se determina la biguanida contenida en soluciones de lavado de lentes de contacto, soluciones viscosas y champús. (71).

II.4.5.1.- METODO CONVENCIONAL

Se elige para llevar a cabo la determinación la especie Verde de Bromocresol-Clorhexidina-Triton X-100 de estequiometría 1:2 por ser más estable que la 1:1, alcanzándose la saturación para relaciones $C_{VB}/C_{Clorh.} = 2,9$.

1.-CUMPLIMIENTO DE LA LEY DE BEER

Se realizan tres series de medidas a diferentes concentraciones de verde de bromocresol (manteniendo un exceso de 3 veces sobre la concentración de clorhexidina máxima) y Triton X-100. Todas las disoluciones se preparan en aforados de 25 ml y se mide su absorbancia a 630 nm en celdas de 1 cm de camino óptico y termostatando a 25°C.

Para la 1ª serie se pipetea 3,8 ml de verde de bromocresol $5,54 \cdot 10^{-4}$ M, a las que se añaden cantidades crecientes de clorhexidina $7,73 \cdot 10^{-4}$ M, 5 ml de tampón y 1 ml de tensioactivo al 2,5 %.

En la segunda experiencia la concentración de verde de bromocresoles $1,11 \cdot 10^{-4}$ M y la de triton X-100 0,2 % y en la tercera serie se toman 10 ml del reactivo $5,54 \cdot 10^{-4}$ M, siendo la concentración de surfactante del 0,5 %.

Los blancos correspondientes se preparan de la misma forma omitiendo la clorhexidina.

Resultados y discusión

Las rectas de calibrado y las gráficas de Ringbom correspondientes se dan en las figuras 67 y 68 y los valores de absorbancia en la tabla 92.

Se observa que a medida que aumenta la concentración de triton X-100 presente, disminuye el valor del coeficiente de absortividad molar desde un valor de 14.200 a 11.400 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, a la vez que se amplía el rango de linealidad.

Los intervalos de concentración óptimos se hallan mediante el gráfico de Ringbom (figura 68), el cual nos indica que el rango de clorhexidina afectado de mínimo error es $1,48 \cdot 10^{-5}$ M a $5,56 \cdot 10^{-5}$ M.

La pendiente del tramo recto del gráfico de Ringbom para las tres series realizadas es de aproximadamente 0,8 unidades de transmitancia, para una variación de 10 veces en el rango de concentración, lo que supone unos errores relativos del 2,9 % y 0,6 % en la precisión del análisis para unos errores fotométricos absolutos del 1 y 0,2 %, respectivamente.

Tabla 92.- Ley de Beer. Gráfico de Ringbom.

1ª serie

Concentración de Clorhexidina (M)	log C	A	1 - T
$6,2 \cdot 10^{-6}$	-5,21	0,050	0,109
$9,3 \cdot 10^{-6}$	-5,03	0,093	0,193
$1,24 \cdot 10^{-5}$	-4,91	0,138	0,272
$1,55 \cdot 10^{-5}$	-4,81	0,178	0,336
$1,85 \cdot 10^{-5}$	-4,73	0,222	0,400
$2,16 \cdot 10^{-5}$	-4,67	0,264	0,456
$2,47 \cdot 10^{-5}$	-4,61	0,305	0,505
$2,78 \cdot 10^{-5}$	-4,56	0,352	0,555
$3,09 \cdot 10^{-5}$	-4,51	0,405	0,606
$3,40 \cdot 10^{-5}$	-4,47	0,450	0,645
$3,71 \cdot 10^{-5}$	-4,43	0,525	0,702

2ª serie

Concentración de Clorhexidina (M)	log C	A	1 - T
5,0 10 ⁻⁶	-5,31	0,055	0,119
9,3 10 ⁻⁶	-5,03	0,114	0,231
1,48 10 ⁻⁵	-4,83	0,177	0,335
2,23 10 ⁻⁵	-4,65	0,271	0,464
2,97 10 ⁻⁵	-4,53	0,365	0,569
3,71 10 ⁻⁵	-4,43	0,460	0,653
4,33 10 ⁻⁵	-4,36	0,531	0,706
4,95 10 ⁻⁵	-4,31	0,614	0,757
5,56 10 ⁻⁵	-4,26	0,687	0,794

3ª serie

Concentración de Clorhexidina (M)	log C	A	1 - T
7,7 10 ⁻⁵	-5,11	0,100	0,206
1,55 10 ⁻⁵	-4,81	0,190	0,354
2,23 10 ⁻⁵	-4,65	0,262	0,453
2,97 10 ⁻⁵	-4,53	0,355	0,558
3,71 10 ⁻⁵	-4,43	0,438	0,635
4,33 10 ⁻⁵	-4,36	0,514	0,694
4,95 10 ⁻⁵	-4,31	0,584	0,739
5,56 10 ⁻⁵	-4,25	0,644	0,773
6,18 10 ⁻⁵	-4,21	0,720	0,809
6,80 10 ⁻⁵	-4,17	0,781	0,834

Continuación tabla 92

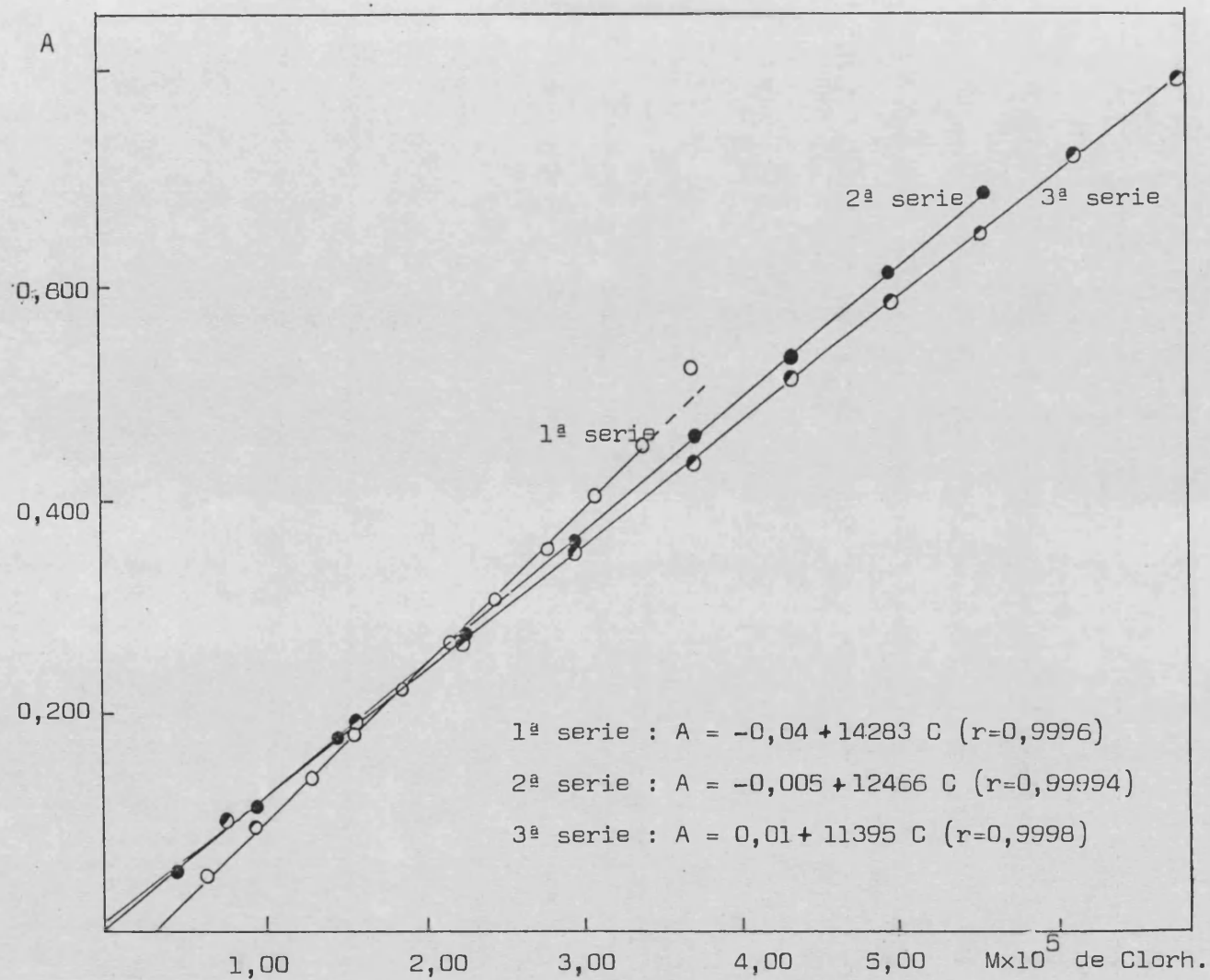


Figura 67.- Ley de Beer. (ver tabla 92).

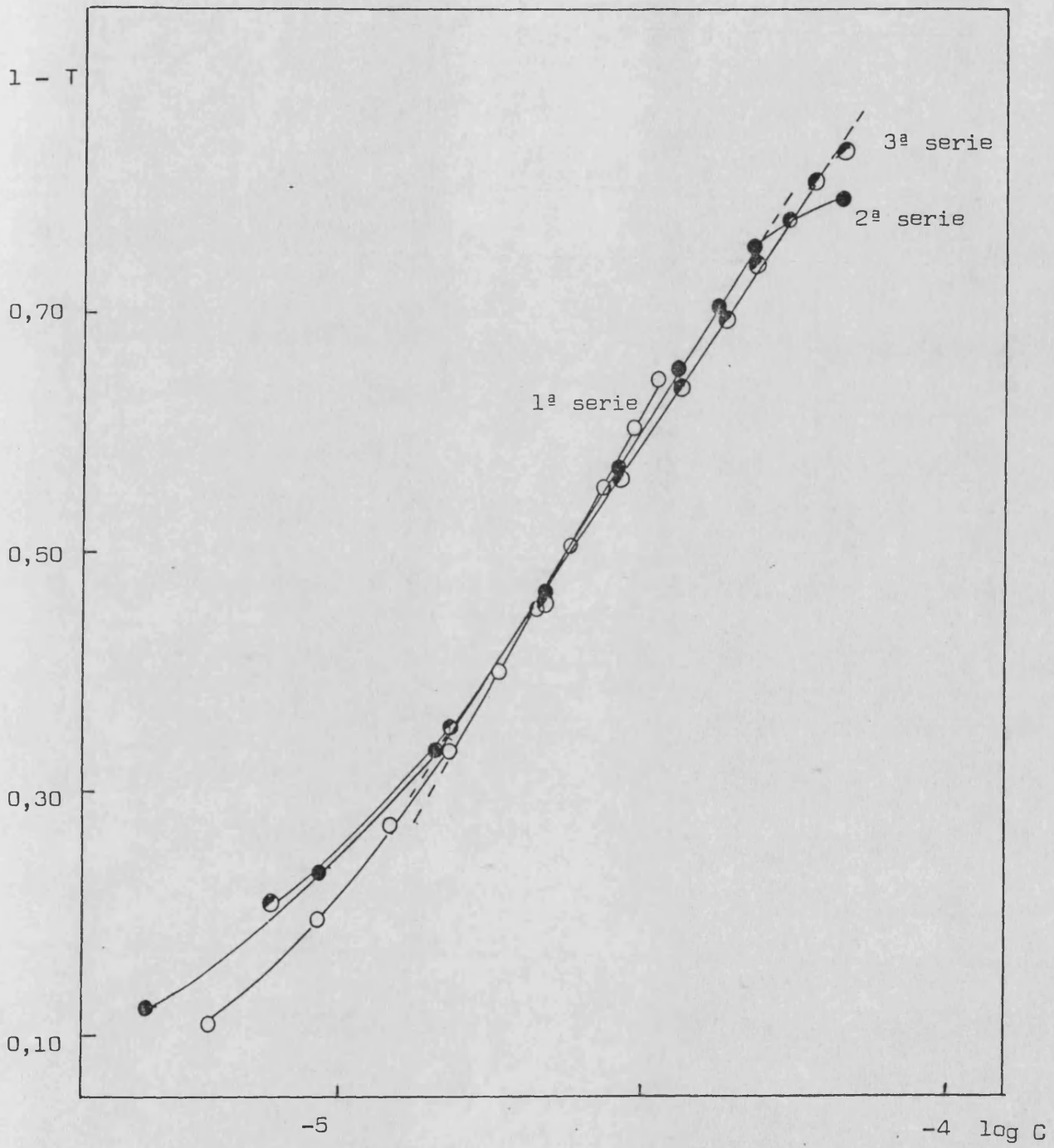


Figura 68.- Gráfico de Ringbom (ver tabla 92)

2.- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Método

Se mide la absorbancia de 4 series de 10 disoluciones preparadas cada una de ellas independientemente de las otras, pero idénticas en la que respecta a la concentración de verde de bromocresol, clorhexidina, triton X-100, pH y fuerza iónica dentro de cada serie.

Las concentraciones de verde de bromocresol y triton X-100 son iguales para las tres primeras series, siendo las respectivas concentraciones de clorhexidina $1,26 \cdot 10^{-5}$, $2,16 \cdot 10^{-5}$ y $3,40 \cdot 10^{-5}$ M.

En la cuarta serie la concentración de verde de bromocresol y triton X-100 son superiores, siendo la de clorhexidina $3,49 \cdot 10^{-5}$ M.

Las lecturas de absorbancia se realizan a 630 nm frente a un blanco patrón preparado de la misma forma que las respectivas disoluciones, pero omitiendo la clorhexidina.

Resultados

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 93.

Las desviaciones standard relativas calculadas oscilan entre 0,4 y 1,3 %.

nº	Absorbancia			
	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄
1	0,135	0,264	0,449	0,535
2	0,130	0,261	0,447	0,538
3	0,130	0,262	0,445	0,534
4	0,132	0,268	0,446	0,541
5	0,132	0,268	0,445	0,544
6	0,130	0,266	0,444	0,539
7	0,132	0,262	0,443	0,541
8	0,130	0,265	0,445	0,538
9	0,133	0,265	0,446	0,532
10	0,133	0,267	0,443	0,539
% drs	1,3	1,0	0,4	0,7

Tabla 93.- Reproducibilidad del método. Para d₁, d₂ y d₃ las concentraciones iniciales de verde de bromocresol y triton X-100 son $7,76 \cdot 10^{-5}$ M y 0,1 % , respectivamente. Las de clorhexidina correspondientes son: $1,24 \cdot 10^{-5}$, $2,16 \cdot 10^{-5}$ y $3,40 \cdot 10^{-5}$ M. Para d₄: verde debromocresol $1,11 \cdot 10^{-4}$; clorhexidina $3,49 \cdot 10^{-5}$ M y triton X-100 0,2 %.

3.- ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Método

Se preparan disoluciones de clorhexidina e ión interferente y se adicionan los reactivos de la forma descrita. Se mantienen constantes las concentraciones de clorhexidina, verde de bromocresol y triton X-100 : $2,53 \cdot 10^{-5}$ M, $7,76 \cdot 10^{-5}$ M y 0,1 % respectivamente, el pH se iguala a 5,35 y por último se toman medidas de absorbancia frente a un blanco patrón verde de bromocresol-triton X-100 a 630 nm.

La concentración de especie extraña va en aumento hasta alcanzar un "techo" de 100 veces (M/M) ó en su defecto, un error del 3 % respecto a la concentración de la disolución que no contiene ión interferente.

Resultados

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 94.

Ninguna de las especies ensayadas (benzocaína, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico y sacarosa) interfiere en la determinación de clorhexidina aún en un exceso de 100 veces en moles.

Concentración de Clorhexidina (M)	Interferente	Concentración de Interferente (M)	A	\bar{A}
$2,53 \cdot 10^{-5}$	-	-	0,330 0,328 0,332	0,330
$2,53 \cdot 10^{-5}$	Benzocaína	$2,53 \cdot 10^{-3}$	0,328 0,330 0,325	0,328
$2,53 \cdot 10^{-5}$	Acido Acetil salicílico	$2,53 \cdot 10^{-3}$	0,335 0,330 0,332	0,332
$2,53 \cdot 10^{-5}$	Acido ascórbico	$2,53 \cdot 10^{-3}$	0,330 0,328 0,327	0,328
$2,53 \cdot 10^{-5}$	Sacarosa	$2,53 \cdot 10^{-3}$	0,328 0,330 0,329	0,329

Tabla 94.- Estudio de especies interferentes .

4.- DETERMINACION DE CLORHEXIDINA EN HIBITANE 5 %

Método

Se preparan 5 disoluciones idénticas que contienen 1 ml de la solución obtenida al diluir 100 veces el Hibitane al 5%, 3,8 ml de verde de bromocresol $5,54 \cdot 10^{-4}$ M, 5 ml de tampón y 1 ml de triton X-100 2,5 %. Todo ello en un volumen final de 25 ml.

Se lee la absorbancia a 630 nm frente a blanco verde de bromocresol- Triton X-100, valor que se extrapola en la ley de Beer correspondiente a la 1ª serie y se obtiene el correspon-



diente valor de concentración.

Resultados

El valor de absorbancia medio de las cinco determinaciones es 0,264, que sustituido en la ecuación $A = -0,04 + 14.283 C$ ($r = 0,9996$) proporciona un valor de concentración de clorhexidina de $2,13 \cdot 10^{-5}$ M, que corresponde a una concentración en la disolución madre de Hibitane 5 % de 4,7 %. Dicho valor está de acuerdo con el obtenido mediante la aplicación del método standard (4,6 %), calculándose un error relativo del 2 %.

II.4.5.2.-DETERMINACION DE CLORHEXIDINA POR INYECCION EN FLUJO

Se procede a estudiar la determinación de clorhexidina por inyección en flujo usando detector colorimétrico. Para ello se pone a punto un montaje monocanal, en el cual la misma disolución reactivo debidamente acondicionada hará el papel de portador y en el seno de la misma, se inserta la disolución de muestra problema.

El montaje utiliza la unidad de dilución automática Tecator 5020, provista de dos bombas peristálticas para impulsar el flujo del portador-reactivo y la muestra, respectivamente, y válvula de inyección rotatoria de volumen variable.

El tubo de reacción es de Teflón de 0,5 mm de diametro interior y el detector (colorímetro Perkin-Elmer, Coleman 55) va provisto de una celda de flujo de vidrio de 1 cm de camino óptico y 18 μ l de capacidad. El registrador es Unicam 45 AR.

La reacción utilizada es la descrita en las páginas anteriores: reacción con verde de bromocresol en presencia de triton X-100. Los valores de absorbancia se leen a 630 nm.

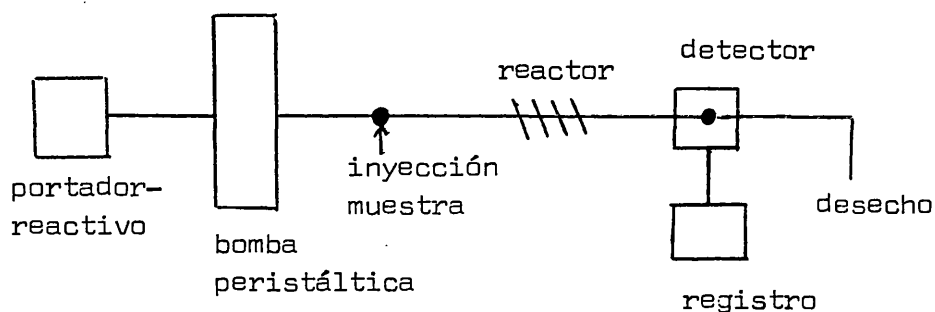


Figura 69.- Diagrama de flujo del sistema para la determinación de clorhexidina.

Se realizaron ensayos previos variando las concentraciones de reactivos en el portador (verde de bromocresol, triton X-100) así como el volumen de muestra insertada (clorhexidina en solución acuosa). Se obtuvieron picos cuando la relación C_{VB}/C_{Clorh} era 1 ó inferior.

Una vez observada la posibilidad de analizar muestras de clorhexidina con la técnica FIA se procede a estudiar las variables experimentales con vistas a su optimización.

Se estudia la variación de caudal, volumen de muestra, longitud del reactor, rango de aplicación e influencia de especies extrañas. En cada caso se tiene en cuenta tanto la sensibilidad de la determinación (altura de pico) como la reproducibilidad de la misma (% dsr).

Las experiencias se llevan a cabo preparando 500 ml de portador-reactivo de la siguiente composición:

50 ml de verde de bromocresol $5,15 \cdot 10^{-4}$ M, 2,5 ml de triton X-100 12,5 % y 100 ml de tampón succínico-succinato de pH 5,35 y fuerza iónica 0,5 M.

La concentración de clorhexidina utilizada fue $7,9 \cdot 10^{-5}$ M.

1.- VARIACION DE LA VELOCIDAD DE FLUJO

Se varía el caudal del reactivo-portador entre 1,34 - 5,55 ml/mn para diferentes volúmenes de muestra (30, 60, 100 y 140 μ l) y distintas longitudes del reactor. Se realizan cinco inyecciones para cada caso.

Resultados

Los resultados obtenidos se dan en las tablas 95 y 96. En la figura 70 se representan las alturas de pico frente a la velocidad del portador, mostrándose también algunos de los picos obtenidos en las figuras 71 y 72.

En el gráfico 70 se observa que para volúmenes de muestra de 30 μ l la velocidad que proporciona alturas de pico superiores es la de 2,61 ml/mn , mientras que para el resto de volúmenes de inyección ensayados la que resulta más ventajosa es la de 3,14 ml/mn, sin embargo, para determinadas longitudes del camino de reacción también pueden considerarse apropiadas las velocidades de 1,71 y 2,61 ml/mn. Los valores de la desviación standard relativa oscilan entre 0,5 y 2,4 % , no permitiendo rechazar ninguna condición ensayada.

Volumen de muestra 30 microlitros

		Velocidad del portador (ml/mn)			
longitud del tubo (cm)		1,71	2,61	2,73	3,14
67	\bar{A}	0,051	0,070	0,066	0,064
	\bar{h} (cm)	4,2	5,7	5,4	5,2
	% dsr	1,9	1,4	1,4	1,0
92	\bar{A}	0,049	0,071	0,051	
	\bar{h} (cm)	4,0	5,8	4,2	-
	% dsr	2,0	1,4	2,1	
117	\bar{A}	0,040	0,040	0,038	0,031
	\bar{h} (cm)	3,3	3,2	3,0	2,4
	% dsr	1,4	1,7	2,0	1,0
142	\bar{A}	0,034	0,038		0,026
	\bar{h} (cm)	2,8	3,0	-	1,9
	% dsr	1,9	2,4		1,0

Volumen de muestra 60 microlitros

		velocidad del portador (ml/mn)					
longitud del tubo (cm)		1,34	1,71	2,61	2,73	3,14	5,55
42	\bar{A}			0,046		0,040	
	\bar{h} (cm)	-	-	3,8	-	3,3	-
	% dsr			2,0		1,7	
67	\bar{A}	0,070	0,087	0,086	0,086	0,087	0,064
	\bar{h} (cm)	5,6	7,1	7,0	7,0	7,1	5,1
	% dsr	2,0	1,2	1,0	1,4	0,8	0,9
92	\bar{A}		0,094	0,092	0,094	0,096	
	\bar{h} (cm)	-	7,6	7,4	7,6	7,8	-
	% dsr		0,6	0,9	0,6	1,0	
117	\bar{A}		0,080	0,081	0,082	0,087	
	\bar{h} (cm)	-	6,5	6,6	6,7	7,1	-
	% dsr		1,3	0,9	1,4	0,9	
142	\bar{A}		0,026		0,060		
	\bar{h} (cm)	-	6,2	-	4,9	-	-
	% dsr		0,9		1,0		

Tabla 95.- Optimización de variables FIA.

Volumen de muestra 100 microlitros

		velocidad del portador (ml/cm)					
longitud del tubo (cm)		1,34	1,71	2,61	2,73	3,14	5,55
92	\bar{A}		0,073	0,086	0,071		
	\bar{h} (cm)	-	5,7	6,9	5,7	-	-
	% dsr		1,0	1,5	1,0		
117	\bar{A}	0,081	0,095	0,094	-	0,096	0,096
	\bar{h} (cm)	6,5	7,6	7,5	-	7,7	7,7
	% dsr	1,0	1,1	1,1		0,7	1,5
142	\bar{A}		0,102	0,100	0,101	0,102	
	\bar{h} (cm)	-	8,2	8,0	8,1	8,2	
	% dsr		0,7	0,9	1,1	0,5	
167	\bar{A}		0,072	0,075	0,078	0,086	
	\bar{h} (cm)	-	5,6	6,0	6,2	6,9	-
	% dsr		2,0	1,9	1,0	0,7	

Volumen de muestra 140 microlitros

		velocidad del portador (ml/mn)			
longitud del tubo (cm)		1,71	2,61	2,73	3,14
117	\bar{A}		0,102		
	\bar{h} (cm)	-	8,2	-	-
	% dsr		1,6		
142	\bar{A}	0,095	0,100	0,103	0,096
	\bar{h} (cm)	7,6	8,0	8,2	7,7
	% dsr	0,8	1,0	0,7	0,8
167	\bar{A}	0,056	0,075	0,075	0,076
	\bar{h} (cm)	4,5	6,0	6,0	6,1
	% dsr	1,3	1,0	2,0	0,9

Tabla 96.- Optimización de variables FIA.

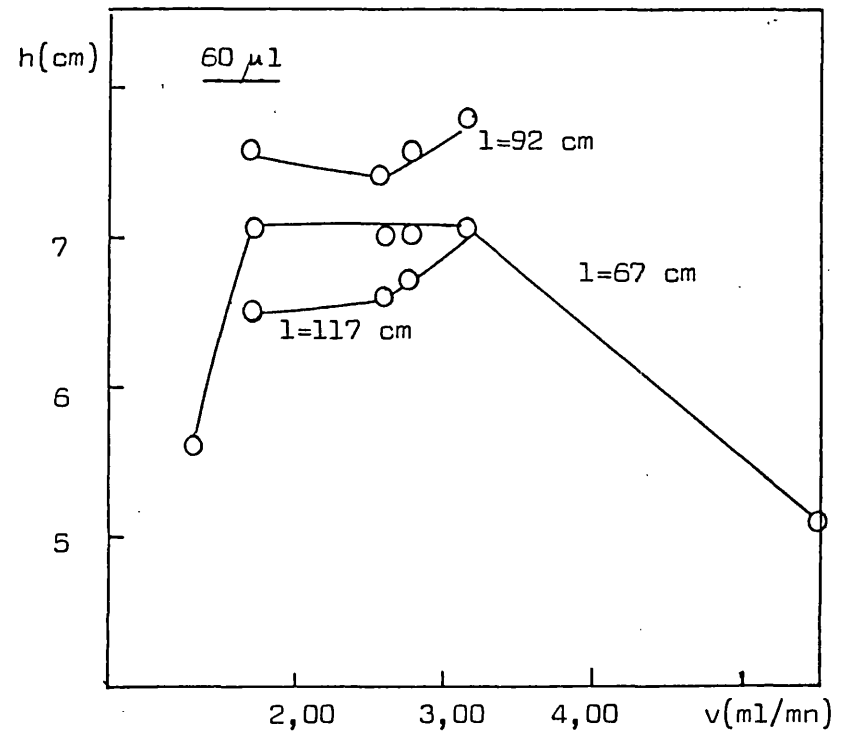
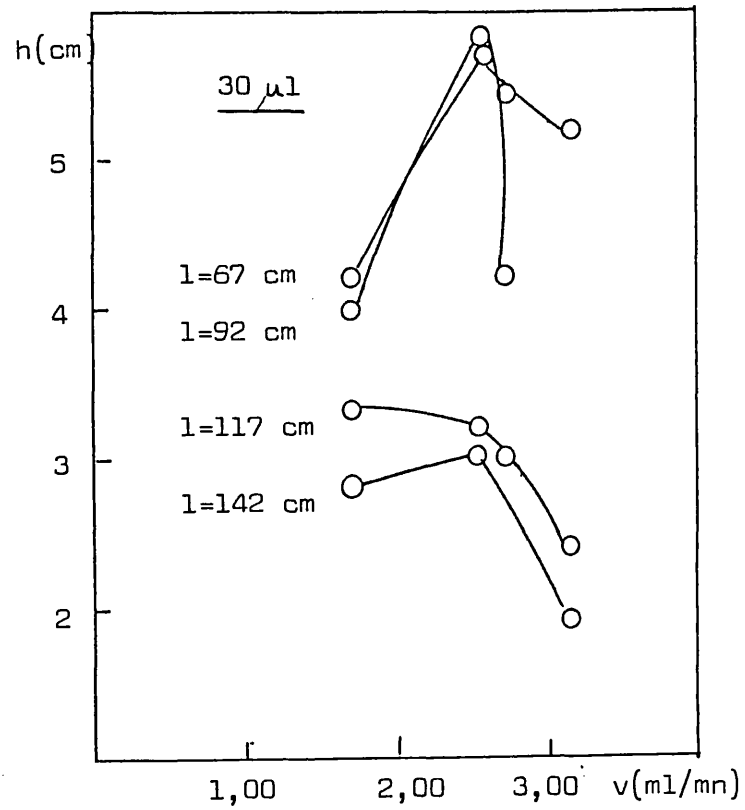


Figura 70.a.- Optimización de variables FIA: Influencia en la altura de pico de la velocidad de flujo.

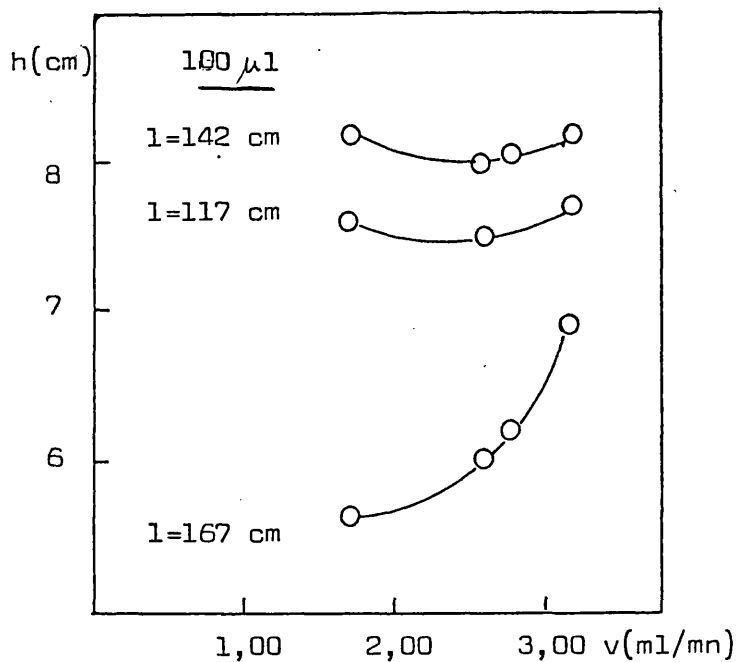
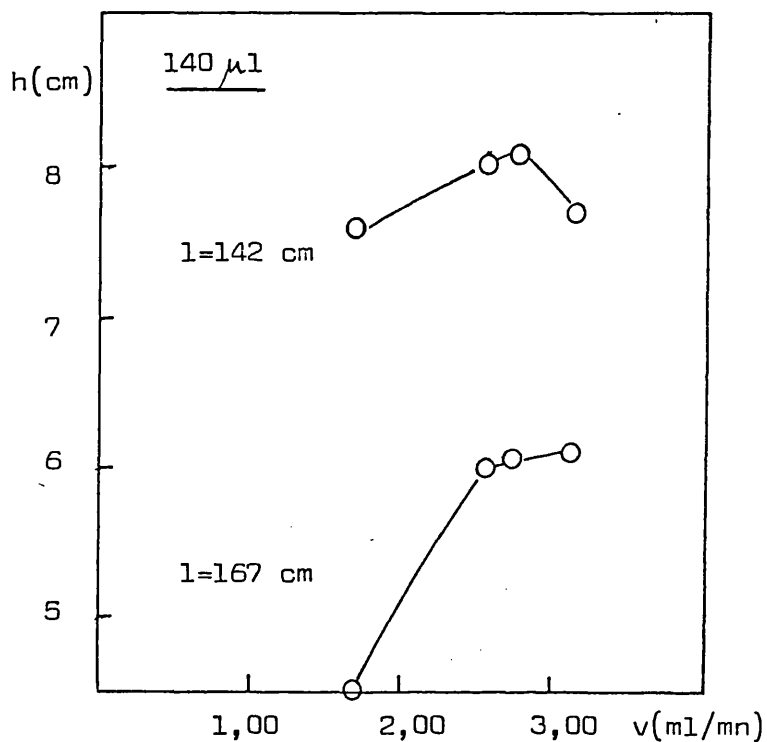


Figura 70 b.- Optimización de variables FIA: influencia en la altura de pico de la velocidad de flujo.

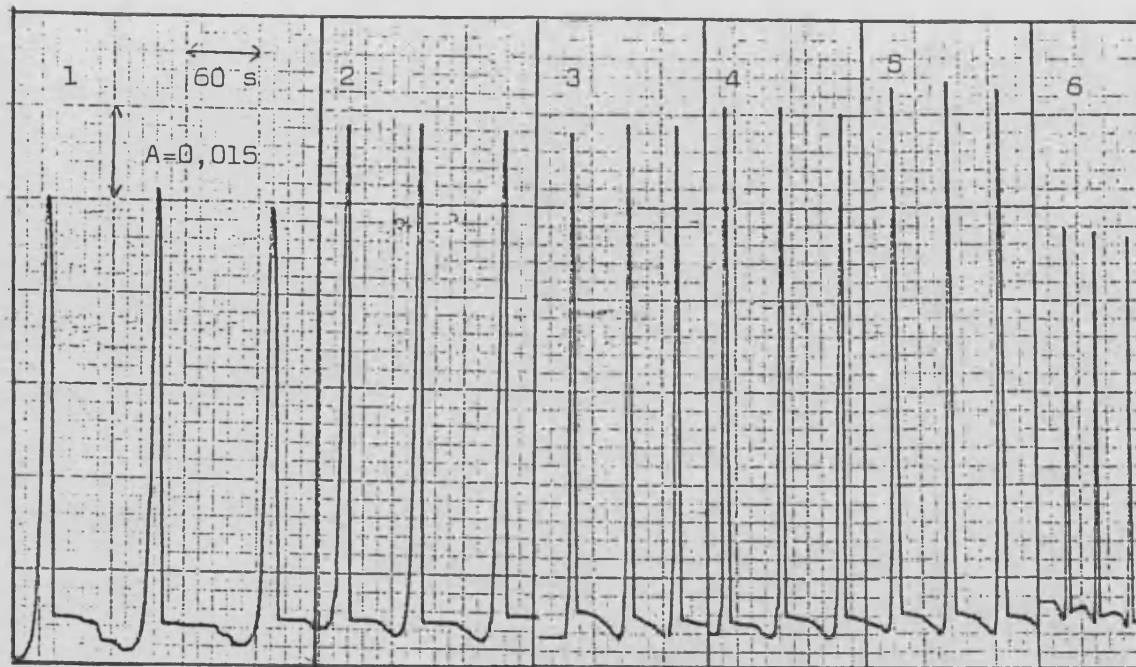


Figura 71.- Variación de la velocidad de flujo para un volumen de inyección de muestra de 60 microlitros y un camino de reacción de 67 cm. 1.- 1,34 ml/mn; 2.- 1,71 ; 3.- 2,61; 4.- 2,73; 5.- 3,14 y 6.- 5,15.

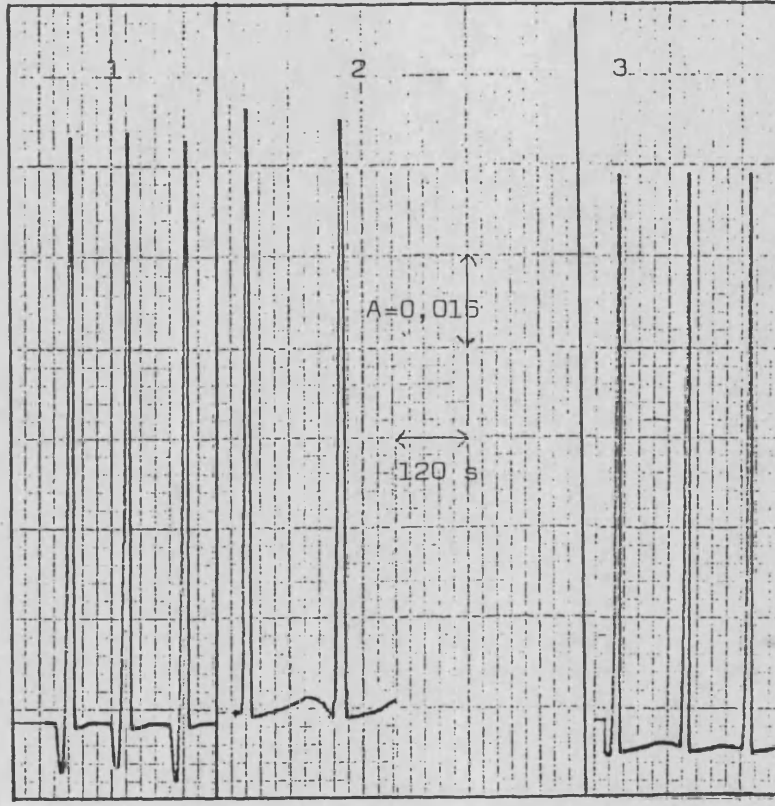


Figura 72.- Variación de la velocidad de flujo para un volumen de inyección de muestra de 100 microlitros y un camino de reacción de 142 cm. 1.- 1,71 ml/mn ; 2.- 3,14 y 3.- 2,61.

2.- VARIACION DE LA LONGITUD DEL REACTOR

El intervalo de caminos de reacción estudiado va de 42 (mínima distancia que se podía utilizar con el instrumental descrito) a 167 cm para los cuatro volúmenes distintos de muestra.

Resultados y discusión

En la tabla 95 y 96 se muestran los resultados obtenidos y en la figura 73 se representan las alturas de pico frente a la longitud del camino de reacción para las velocidades de flujo de 1,71 ; 2,61 ; 2,73 y 3,14 ml/mn. A la vista de la mencionada figura se elige como camino de reacción óptimo 92 cm para una velocidad de flujo de 3,14 ml/mn y un volumen de inyección de muestra de 60 microlitros, por proporcionar una sensibilidad adecuada. Para volúmenes de inyección de 100 y 140 microlitros se consiguen sensibilidades similares a la de 60 microlitros con las mayores longitudes del tubo de reacción estudiadas.

La figura 74 muestra alguno de los picos obtenidos, cabe señalar que para caminos de reacción inferiores ó iguales a 92 cm y para volúmenes de muestra insertada de 100 ó 140 microlitros se obtienen picos dobles, lo que puede indicar que la reacción no ha transcurrido igualmente en todo el "bolo" de muestra. Cuando la longitud es de 167 cm se observan valores negativos en la cola de cada pico, este fenómeno es generalmente imputable a las diferencias de índice de refracción y se puede solucionar con otros montajes distintos (por ejemplo "mencing zones"). Este mismo fenómeno se observa a longitudes inferiores para el caso de los volúmenes de inyección de 30 y 60 microlitros.

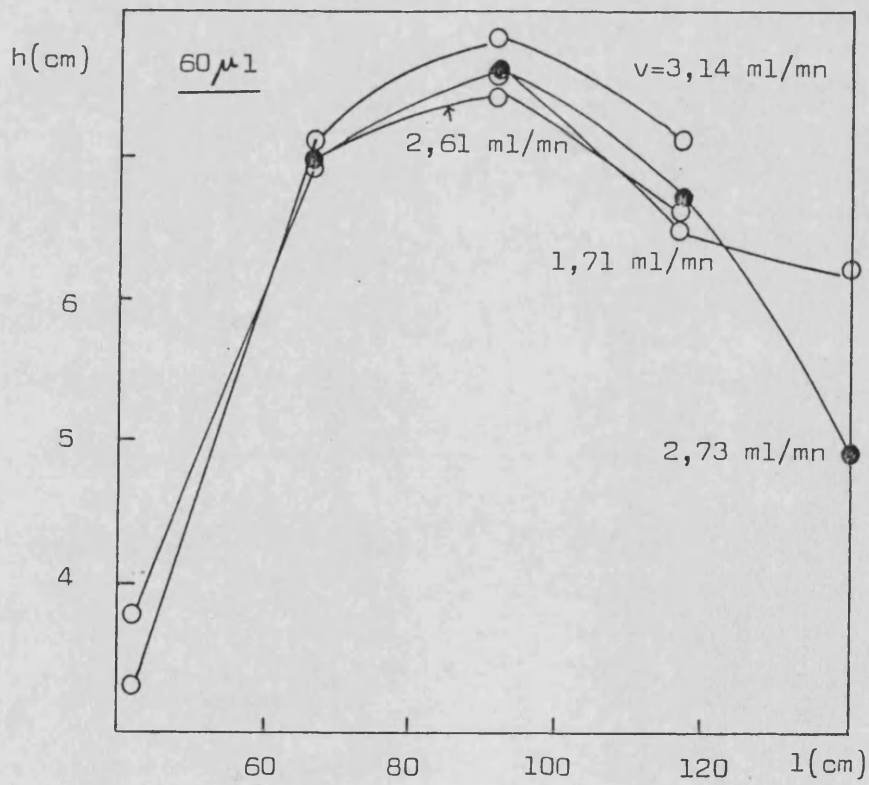
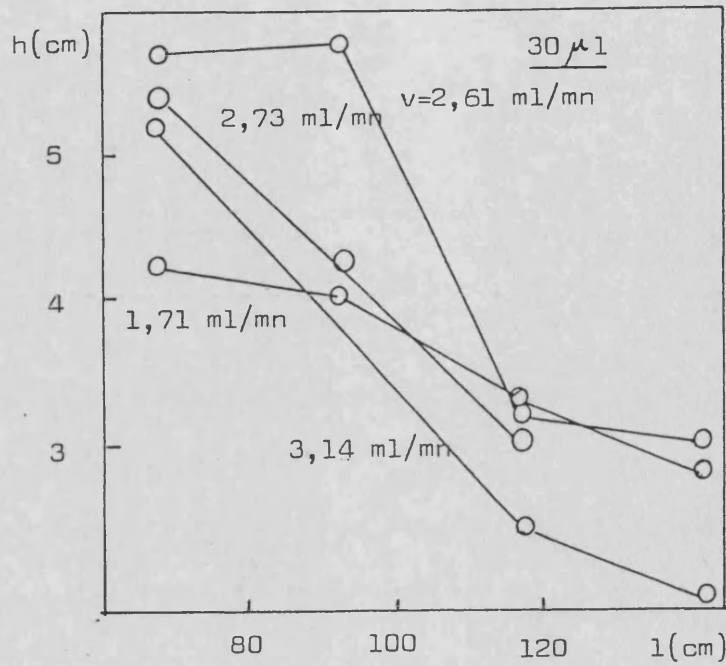


Figura 73a.- Optimización de variables FIA: influencia en la altura de pico de la longitud del reactor.

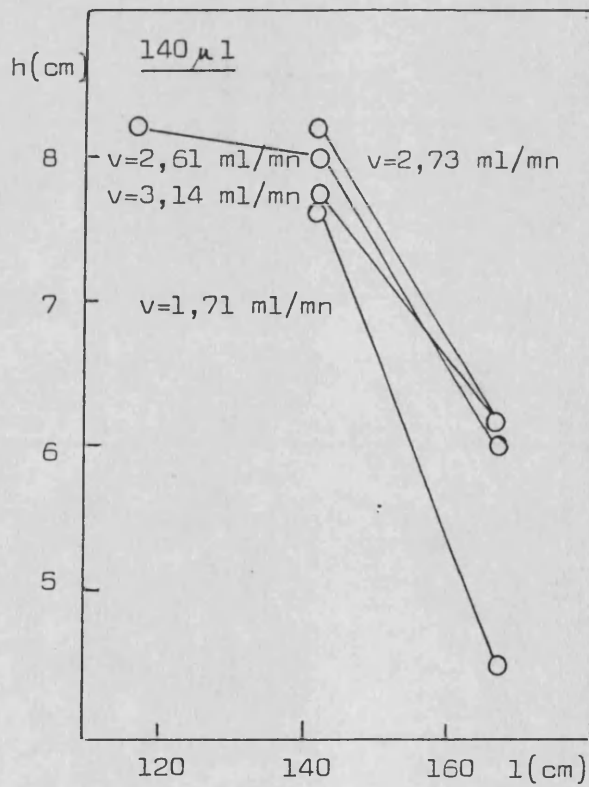
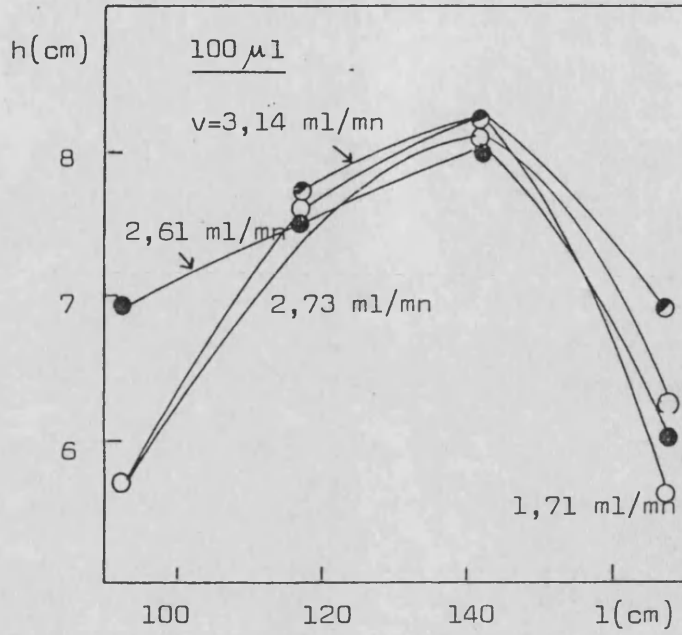
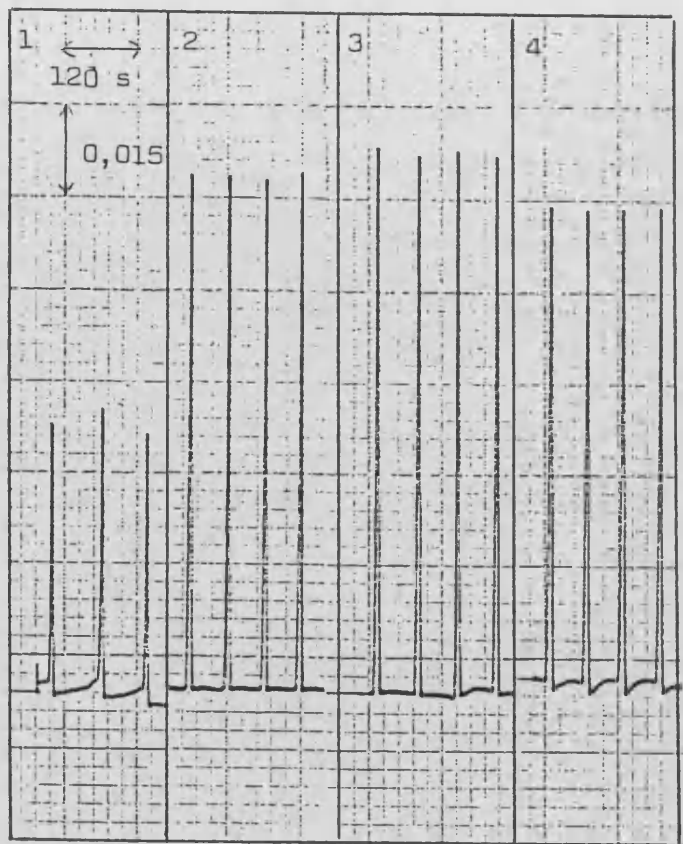
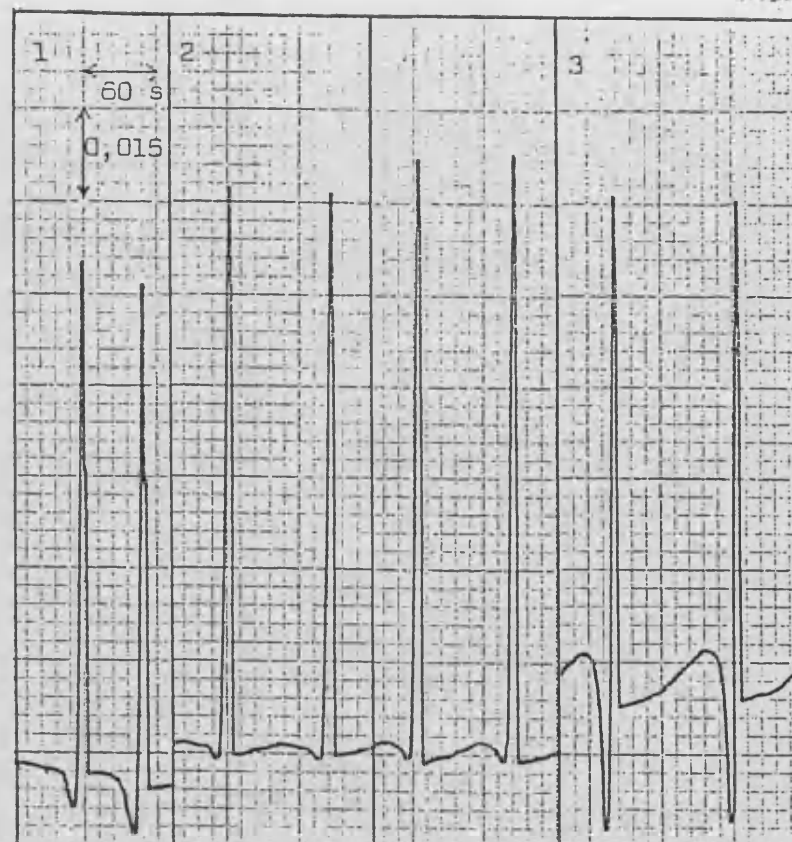


Figura 73b.- Optimización de variables FIA: influencia en la altura de pico de la longitud del reactor.



60 μ l y 2,61 ml/mn
 1.- 42 cm, 2.- 67, 3.- 92, 4.- 117



100 μ l y 3,14 ml/mn
 1.- 92 cm, 2.- 117, 3.- 142.

Figura 74.- Variación del camino de reacción.

3.- ESTUDIO QUIMICO DE LA REACCION VERDE DE BROMOCRESOL-CLORHEXIDINA EN PRESENCIA DE TRITON X-100 EN UN SISTEMA DE FLUJO CONTINUO.

El estudio de la reacción verde de bromocresol-clorhexidina en presencia de triton X-100 se ha realizado en condiciones estáticas, donde se alcanza el estado de equilibrio. Dado que en las técnicas FIA no suele alcanzarse dicho equilibrio, además de tener lugar fenómenos de dispersión de la muestra, se creyó conveniente repasar el estudio químico de la reacción. También hay que recordar que la reacción puede dar lugar a dos compuestos verde de bromocresol-clorhexidina distintos de estequiometría 1:1 y 2:1.

Para ello se utilizan las condiciones FIA que en las páginas anteriores se revelan óptimas, es decir: 3,14 ml/mn, 92 cm de reactor y 60 microlitros de muestra inyectada.

Las variables químicas estudiadas son:

- a).- Influencia del pH
- b).- Influencia de la concentración de verde de bromocresol
- c).- Influencia de la concentración de Triton X-100

a) Influencia del pH

Método

La concentración de verde de bromocresol estudiada es de $5,15 \cdot 10^{-5}$ M (0,063 % de triton X-100) y la de clorhexidina $7,23 \cdot 10^{-5}$ M ajustándose el pH añadiendo 20 ml del tampón por cada 100 ml de disolución portadora. Las diferentes soluciones tampón succínico-succinato son todas ellas de fuerza iónica 0,5 M.

En este primer estudio se realizan lecturas de absorbancia a cuatro longitudes de onda distintas 620, 630, 640 y 650 nm, para observar algún hipotético corrimiento de las bandas obtenidas anteriormente.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 97, representándose las alturas de pico frente al pH para distintas longitudes de onda en la figura 75. En esta figura se observa que para 630 nm la curva obtenida presenta una meseta en el intervalo de pH que va de 4,80 a 5,15; esta misma meseta se obtiene para un rango de pH más restringido (4,80-4,96) para las demás longitudes de onda ensayadas, desviándose positiva (640, 650 nm) ó negativamente (620 nm) para el intervalo de pH que va de 4,96 a 5,15.

A la vista de estos resultados la longitud de onda óptima sigue siendo la de 630 nm, por lo que el rango de pH idóneo es 4,80-5,15.

pH		longitud de onda (nm)			
		620	630	640	650
4,53	A	0,064	0,077	0,077	0,059
	h(cm)	3,6	4,3	4,3	3,3
	% dsr	1,6	1,2	1,2	1,5
4,80	A	0,091	0,100	0,100	0,091
	h(cm)	5,1	5,6	5,6	5,1
	% dsr	0,5	0,9	0,5	1,1
4,96	A	0,091	0,102	0,104	0,093
	h(cm)	5,1	5,7	5,8	5,2
	% dsr	0,5	0,5	0,9	0,9
5,15	A	0,082	0,100	0,110	0,105
	h(cm)	4,6	5,6	6,2	5,9
	% dsr	1,2	0,8	0,9	0,9
5,33	A	0,059	0,068	0,091	0,091
	h(cm)	3,3	3,8	5,2	5,1
	% dsr	1,0	1,2	1,1	1,1
5,45	A	0,041	0,064	0,088	0,095
	h(cm)	2,3	3,6	4,9	5,3
	% dsr	1,0	1,6	1,0	1,0

Tabla 97.- Influencia del pH.

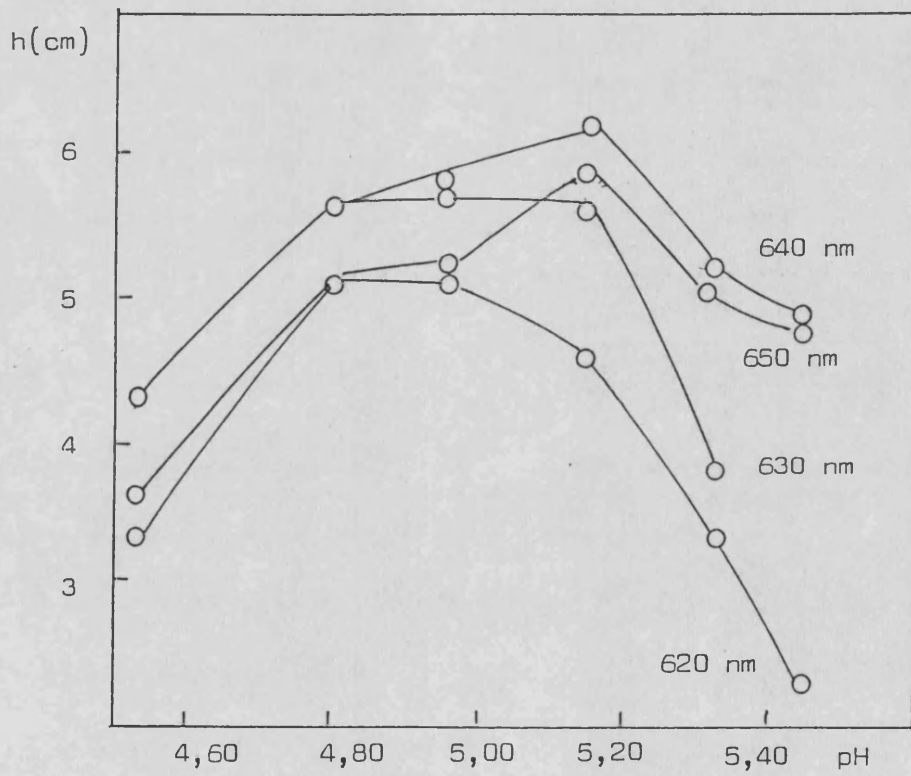


Figura 75.- Influencia del pH en la altura de pico
(ver tabla 97).

b).- Influencia de la concentración de verde de bromocresol

Método

Se preparan distintas soluciones portadoras en las que se mantiene constante la concentración de triton X-100 (0,063 %), pH 5,00 con tampón succínico-succinato y con distintas concentraciones de verde de bromocresol ($5,15 \cdot 10^{-5}$ - $1,26 \cdot 10^{-4}$ M). La concentración de clorhexidina utilizada es de $7,10 \cdot 10^{-5}$ M y las condiciones FIA las que se mencionan en el apartado anterior, procediéndose de la misma forma para obtener los registros correspondientes.

Resultados y discusión

En la tabla 98 se dan los resultados obtenidos.

En la figura 76 que representa la altura de pico frente a la concentración de verde de bromocresol, se observa que aquella es similar desde una relación $C_{VB}/C_{Clorh.}$ de 0,72 a 1,27 decreciendo para relaciones superiores. Esto es explicable teniendo en cuenta que existen dos sistemas VB-Clorhexidina (1:1) y (2:1) tal como se puso de manifiesto en el apartado anterior de la presente Memoria, presentando el (1:1) mayor coeficiente de absorptividad molar y siendo éste el responsable de los picos que aparecen en los distintos Diagramas, puesto que lógicamente debe presentar una velocidad de formación superior.

Concentración de V.B. (M)	\bar{A}	\bar{h} (cm)	% dsr
$5,15 \cdot 10^{-5}$	0,083	4,6	1,1
$5,89 \cdot 10^{-5}$	0,078	4,3	1,1
$7,21 \cdot 10^{-5}$	0,078	4,3	1,2
$9,05 \cdot 10^{-5}$	0,069	3,8	1,1
$1,26 \cdot 10^{-4}$	0,036	2,0	1,0

Tabla 98.- Influencia de la concentración de verde de bromocresol.

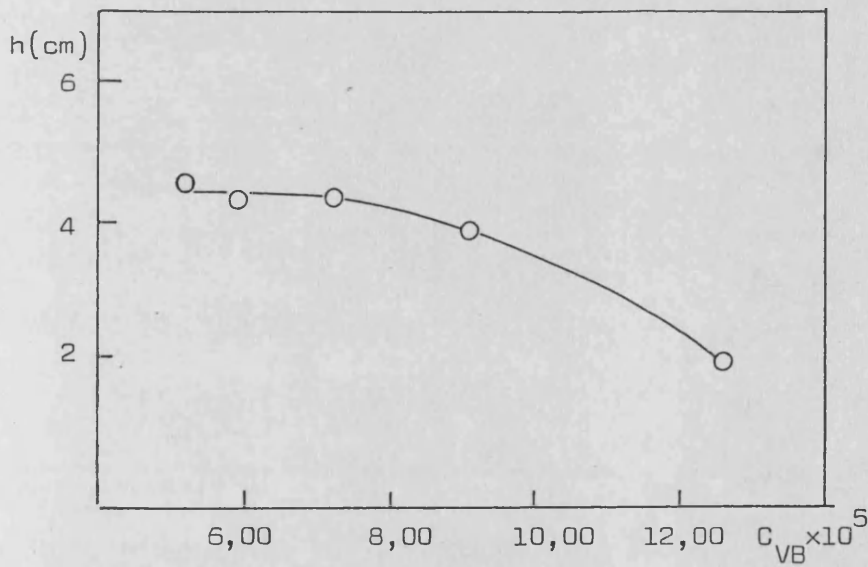


Figura 76.- Influencia de la concentración de Verde de Bromocresol en la altura de pico (ver tabla 98).

c).- Influencia de la concentración de triton X-100

Método

Las disoluciones portadoras contienen verde de bromocresol $7,26 \cdot 10^{-5}$ M, tampón succínico-succinato (pH 5,00, 20 ml por cada 100 ml de volumen final) y cantidades crecientes de triton X-100 desde un 0,031 % a 0,13 %. La clorhexidina utilizada es $7,23 \cdot 10^{-5}$ M. Las absorbancias se leen a 630 nm , registrándose los respectivos picos del modo habitual.

Resultados y discusión

En la tabla 99 se dan los resultados obtenidos y en la figura 77 se representan las alturas de pico frente a la concentración de triton X-100.

De la misma forma que ocurría en el método estático la concentración de triton X-100 es una variable crítica, obteniéndose mayores alturas de pico y una menor dsr para una concentración de tensioactivo del 0,063 %.

% Triton X-100	\bar{A}	\bar{h} (cm)	% dsr
0,031	0,056	2,7	1,9
0,044	0,125	6,0	0,8
0,063	0,150	7,2	0,4
0,094	0,108	5,2	0,9
0,130	0,065	3,1	0,9

Tabla 99.- Influencia de la concentración de Triton X-100

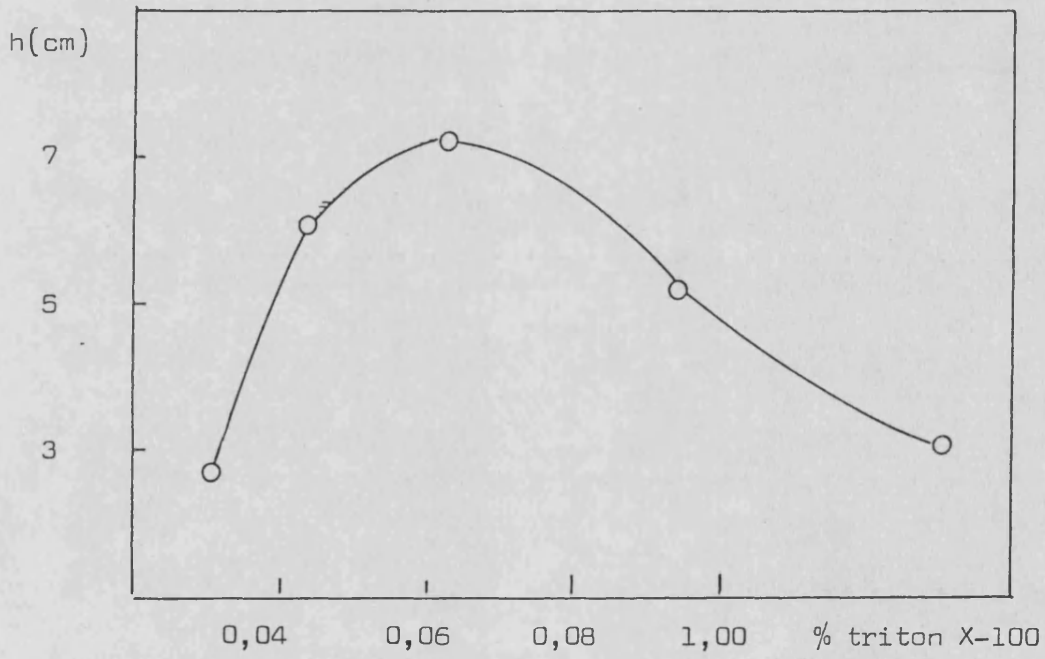


Figura 77.- Influencia de la concentración de triton X-100 en la altura de pico (ver tabla 99).

4.- CARACTERISTICAS ANALITICAS

a).- Recta de calibrado

Método

Se prepara una curva de calibrado para la clorhexidina en las condiciones óptimas encontradas:

volumen de muestra inyectada 60 microlitros

longitud del camino de reacción 92 cm

velocidad de flujo 3,14 ml/mn

La solución portadora está constituida por:

verde de bromocresol $7,26 \cdot 10^{-5}$ M

triton X-100 0,063 %

20 ml de tampón succínico-succinato (I = 0,5 M) de pH 5,00 por cada 100 ml de disolución.

La biguanida se inyecta en solución acuosa , siendo el rango de concentración estudiado de $4,05 \cdot 10^{-5}$ - $1,45 \cdot 10^{-4}$ M, despues de su paso por el tubo de reacción se lee la absorbancia a 630 nm de la solución portadora y se mide la altura de los picos correspondientes. Todas las medidas son realizadas por triplicado.

Resultados y discusión

Los resultados que se obtienen se dan en la tabla 100 y en la figura 78 para el intervalo de clorhexidina que va de $4,05 \cdot 10^{-5}$ a $1,45 \cdot 10^{-4}$ M. Los picos correspondientes se dan en el gráfico 79.



Los ajustes de las rectas obtenidas al representar A y la altura de pico frente a la concentración de los distintos patrones son los siguientes:

$$A = -0,13 + 4015 C \quad (r=0,9993)$$

$$h = -5,21 + 179323 C \quad (r=0,9995)$$

La sensibilidad de la reacción disminuye con respecto al método estático. Este hecho, general para cualquier procedimiento FIA excepto para los métodos cinéticos de stopped-flow, es debido a la dispersión física ó dilución en el flujo de la muestra por una parte y al tiempo de reacción corto por otra, que permite conseguir rendimientos parciales; ambos efectos son contrapuestos en los métodos FIA con proceso químico adicional. Sin embargo, la rapidez y el ahorro de reactivos pueden justificar la utilización del segundo frente al primero.

A todo esto hay que añadir que la reacción utilizada en los procedimientos descritos, estático y FIA, no es la misma ya que se aprovecha la formación del compuesto 1:2 y 1:1 (clorhexidina: verde de bromocresol), respectivamente.

Concentración de Clorhexidina (M)	\bar{A}	\bar{h} (cm)
$4,05 \cdot 10^{-5}$	0,038	2,1
$5,06 \cdot 10^{-5}$	0,075	3,8
$6,07 \cdot 10^{-5}$	0,110	5,5
$7,23 \cdot 10^{-5}$	0,156	7,6
$8,10 \cdot 10^{-5}$	0,200	9,4
$9,11 \cdot 10^{-5}$	0,245	11,3
$1,01 \cdot 10^{-4}$	0,280	13,3
$1,16 \cdot 10^{-4}$	0,340	15,6
$1,30 \cdot 10^{-4}$	0,389	17,8
$1,45 \cdot 10^{-4}$	0,427	19,7

Tabla 100.- Curva de calibrado

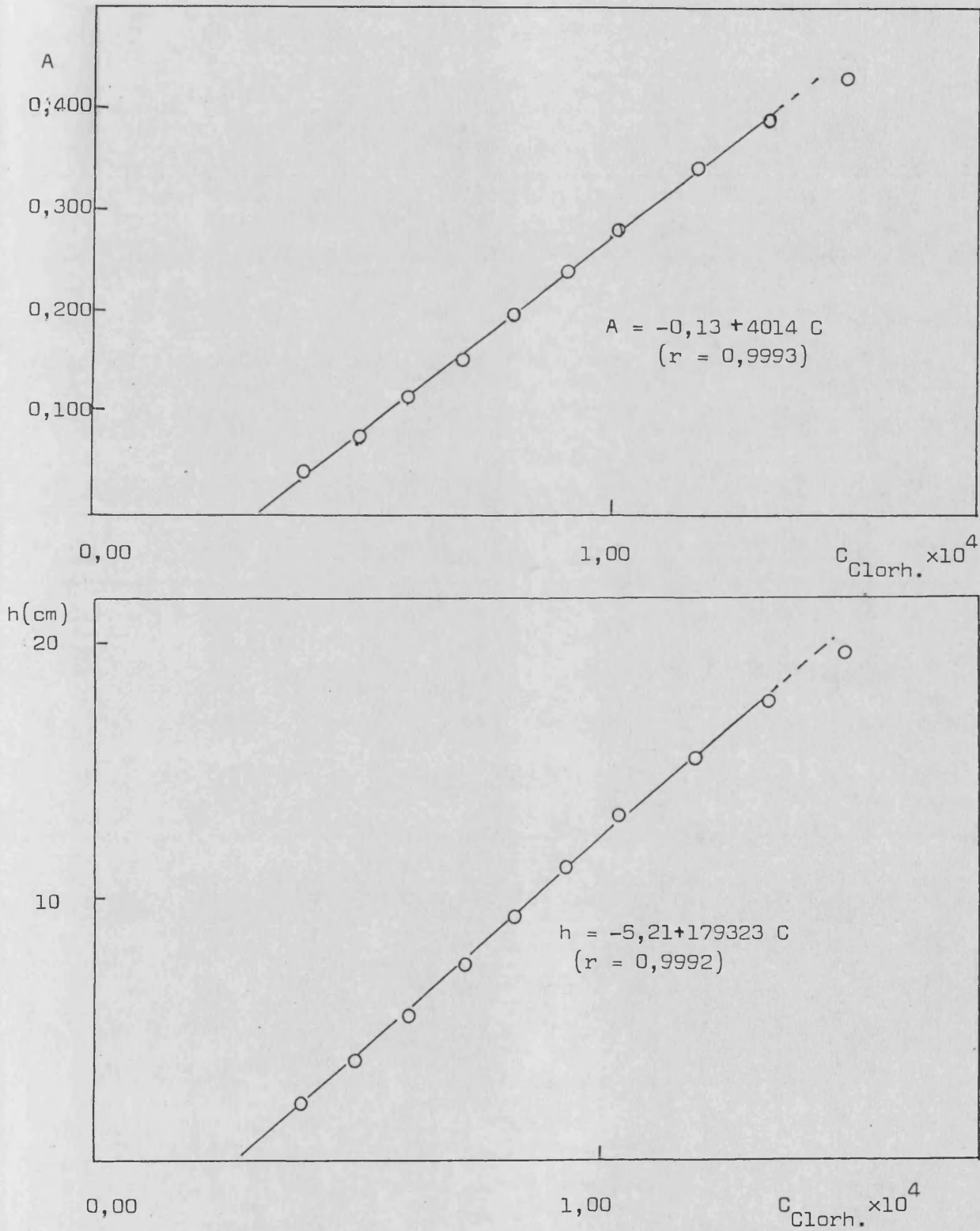


Figura 78.- Curvas de calibrado.

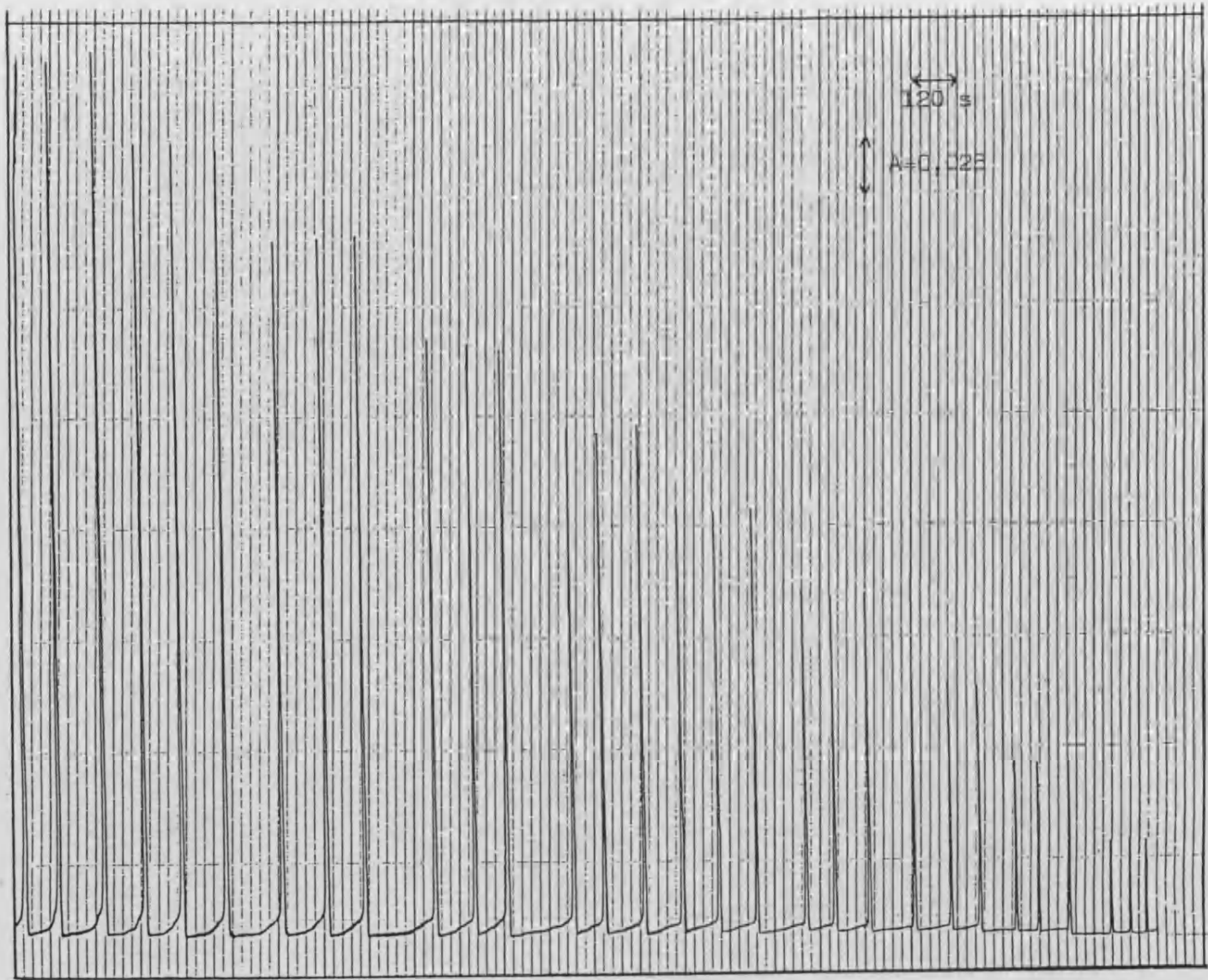


Figura 79. - Picos correspondientes a la curva de calibrado de la tabla 100

b).- Reproducibilidad

La precisión del método propuesto se determinó calculando la desviación standard de los valores obtenidos al inyectar 20 veces un volumen de 60 microlitros de una solución de clorhexidina $8,10 \cdot 10^{-5}$ M. Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado anterior.

Resultados

El valor de la desviación standard encontrado es del 0,8 %. Los picos correspondientes se dan en la figura 80.

La velocidad de muestreo calculada teniendo en cuenta el tiempo invertido en estas 20 inyecciones resulta ser de 63 muestras/hr.

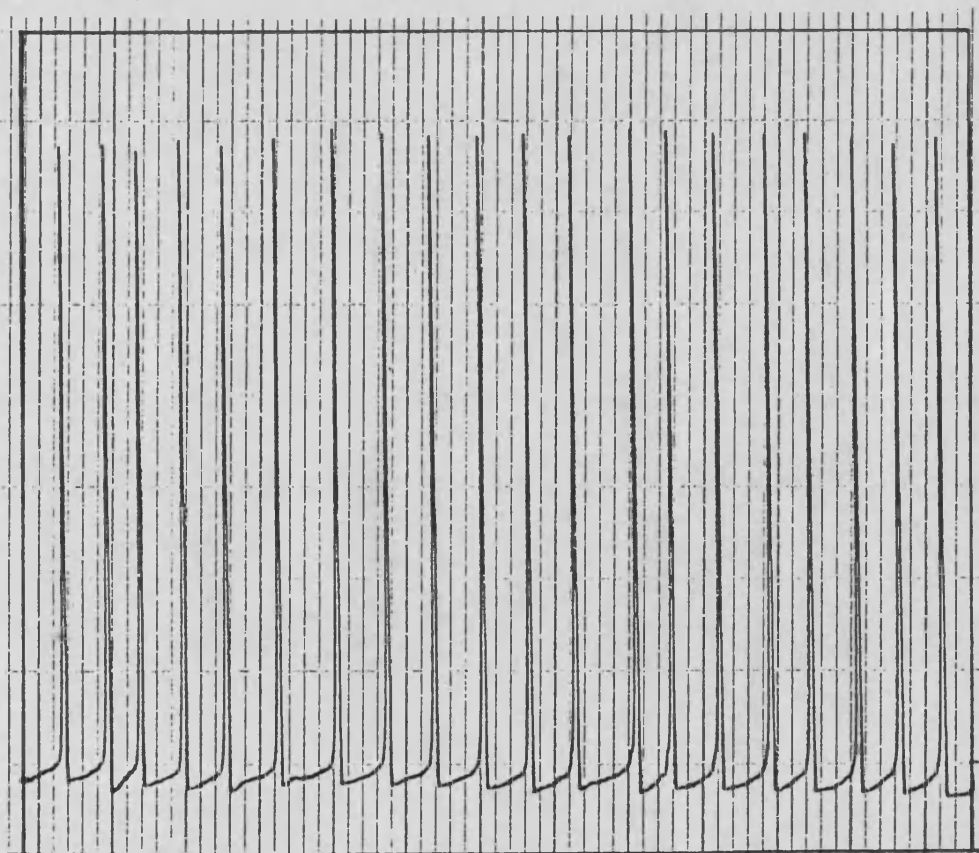


Figura 80.- Reproducibilidad

c).- Estudio de especies interferentes

Método

Se procede al estudio de la influencia que sobre la determinación de clorhexidina pueden ejercer distintas especies (ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, sacarosa y benzocaína) que acompañan a las biguanidas en determinados preparados farmaceuticos.

Para ello se preparan disoluciones de biguanida que contienen a las mencionadas sustancias, procediéndose a realizar las medidas correspondientes del modo habitual. Se elige un techo de 100 veces sobre la concentración de clorhexidina.

La concentración de verde de bromocresol utilizada es de $7,26 \cdot 10^{-5}$ M y la de clorhexidina $8,10 \cdot 10^{-5}$ M.

Resultados y discusión

De las especies ensayadas, la sacarosa no interfiere aún en un exceso de 100 veces y la benzocaína de 5 sobre la concentración de clorhexidina, no admitiendo la disolución acuosa un exceso superior por tener esta una baja solubilidad en agua. Sin embargo, los ácidos acetilsalicílico y ascórbico que en el método estático desarrollado podían estar presentes en una concentración 100 veces superior a la de biguanida, en la determinación FIA solo pueden estar en un exceso de 50 veces. Ambas especies requieren la presencia de tampón en la disolución de muestra que va a ser inyectada (10 ml por cada 50 ml), compro-

bándose previamente que la presencia de solución reguladora en la muestra a inyectar no modifica la altura del pico.

d).- Determinación de Clorhexidina en Hibitane 5 % solución concentrada.

La determinación se realiza por interpolación de la señal obtenida en la zona lineal de la recta de calibrado que se da en el apartado a).

Para ello se pipetea 0,30 ml de la solución de Hibitane 5 % y se diluyen a 200 ml, inyectándose 60 microlitros de dicha muestra en la corriente portadora . La altura de pico obtenida es de 9,1 cm (media de 5 inyecciones) que corresponde a una concentración de clorhexidina de $7,9 \cdot 10^{-5}$ M, que supone una riqueza para la solución madre del 4,7 % , igual a la obtenida mediante la aplicación del método estático desarrollado en el apartado anterior de esta memoria .

II.4.6.- CONCLUSIONES

- Se estudia la reacción entre el verde de bromocresol y la clorhexidina en presencia de triton X-100. Los espectros obtenidos muestran que la clorhexidina intensifica la banda que aparece a 620 nm en disoluciones VB-triton X-100, disminuyendo la intensidad de la banda situada sobre 420 nm.
- El intervalo óptimo de pH resulta ser 5,20 - 5,60, eligiéndose un pH de trabajo de 5,35 (tampon succínico/succinato).
- La concentración de triton X-100 es una variable crítica para la absorbancia que presenta el sistema en cuestión a 630 nm, no modificándose demasiado para concentraciones de tensioactivo superiores al 0,2 %.
- Las disoluciones verde de bromocresol - clorhexidina - triton X-100 son estables por lo menos 24 horas.
- El verde de bromocresol y la clorhexidina forman dos pares iónicos de estequiometrías 1:1 y 2:1 en ausencia de triton X-100.
- En medio triton X-100 también se obtienen las estequiometrías 1:1 y 2:1 para las especies que se forman, como ponen de manifiesto los métodos de variaciones continuas y Asmus. Los valores de las $K_{\text{disociación}}$ condicionales calculadas a partir de las rectas de Asmus correspondientes son de $6,3 \cdot 10^{-5}$ y $8,7 \cdot 10^{-10}$ respectivamente, presentando el sistema 1:1 mayor coeficiente de absortividad molar.

- Se pone a punto un método de determinación espectrofotométrico convencional de clorhexidina con el sistema V B - Clorh-triton X-100 de estequiometría 2:1 que alcanza la saturación a relaciones $C_{VB}/C_{Clorh.} = 2,9$. El coeficiente de absorptividad molar para distintas cantidades de tensioactivo presente oscila entre 14.200 y 11.400. El gráfico de Ringbom da un intervalo de concentración de clorhexidina afectado de mínimo error de $1,48 \cdot 10^{-5} - 5,56 \cdot 10^{-5}$ M.
- El método es reproducible: las dsr calculadas para distintas disoluciones oscilan entre 0,4 y 1,3 %.
- No interfieren en la determinación de la biguanida las especies benzocaína, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico y sacarosa aún en un exceso de 100 veces en moles.
- La determinación de clorhexidina contenida en Hibitane 5 % da un valor de 4,7 % (error relativo respecto al método standard 2 %).
- Se pone a punto un método FIA (montaje monocanal) de determinación de clorhexidina usando detector colorimétrico, aprovechando su reacción con verde de bromocresol en presencia de triton X-100. La solución portadora está constituida por VB - triton X-100 - tampón succínico/succinato y la biguanida se inserta en solución acuosa. Las condiciones FIA óptimas son: volumen de inyección de muestra 60 microlitros, velocidad de flujo 3,14 ml/mn y longitud del reactor 92 cm.
- El intervalo de pH óptimo para llevar a cabo la determinación FIA es 4,80 - 5,15; eligiéndose un pH de trabajo de 5,00 (tampon succínico/succinato).

- El estudio de la influencia del verde de bromocresol en la altura de pico revela que ésta es similar para relaciones $C_{VB}/C_{Clorh.}$ de 0,72 a 1,27, decreciendo para relaciones superiores. El sistema de estequiometría 1:1 es el responsable de los picos que aparecen en los distintos Diagramas, puesto que lógicamente debe presentar una velocidad de formación superior.
- La concentración de tensioactivo óptima es 0,063 %.
- La curva de calibrado obtenida en las condiciones óptimas de trabajo y para una concentración de verde de bromocresol de $7,26 \cdot 10^{-5}$ M y un intervalo de clorhexidina de $4,05 \cdot 10^{-5}$ - $1,30 \cdot 10^{-4}$ M resulta ser:
$$A = -0,13 + 4015 C \quad (r = 0,9993)$$
$$h = -5,21 + 179323 C \quad (r = 0,9995)$$
- El procedimiento FIA presenta una dsr del 0,8 % (20 inyecciones) y permite una velocidad de muestreo de 63 muestras/hr.
- El estudio de interferencias revela que la sacarosa no interfiere en un exceso de 100 veces y la benzocaína de 5 sobre la concentración de clorhexidina no admitiendo la disolución acuosa un exceso superior de esta última. Los ácidos acetylsalicílico y ascórbico no interfieren en un exceso de 50 veces, sin embargo, requieren la presencia de tampón en la disolución de la muestra que se va a inyectar.
- La determinación FIA de clorhexidina en Hibitane 5 % da un resultado de 4,7 %, igual al obtenido en el método convencional propuesto.

II.5.- CONCLUSIONES GENERALES

II.5.- CONCLUSIONES GENERALES

- Se determinan las constantes de acidez de la 2-sulfoetilbiguanida (pK_{a3} 0,85, pK_{a2} 3,2 y 2,97 , pK_{a3} 11,38) y el pK_{ps} de su producto de reacción con Cu(II) (pK_{ps} 20,62). Se aprovecha la reacción del Cu(II) con biguanidas para la valoración conductimétrica de estas últimas. Las biguanidas determinadas son : clorhexidina, proguanil (complejos sólidos) y metformin, moroxidina (complejos solubles).
- La optimización de las condiciones experimentales da como medios más adecuados:
 - a).- Complejos sólidos.- 3 ml de NH_4OH 0,2 M, 9 ml de NaOH 0,01 M diluído a 60 ml con etanol al 15 %.
 - b).- Complejos solubles.- pH entre 11,00 - 11,50 que se consigue con NaOH - NH_3 en relación 1:15.Las sales de Cu(II) elegidas como valorantes son el Cu(Acetato)₂ para el caso de la clorhexidina y proguanil , y el $CuSO_4$ para el metformin y la moroxidina.
- El método es aplicable en el intervalo de concentraciones : clorhexidina $5,76 \cdot 10^{-5}$ - $3,40 \cdot 10^{-4}$ M (E_r 0,4 -1,3 % y dsr 0,9-1,2 %) ; metformin $2,55 \cdot 10^{-4}$ - $1,70 \cdot 10^{-3}$ M (E_r 1,1 - 2,0 % y dsr 0,8 - 1,7 %).
- Se estudia la influencia de especies extrañas contenidos en los preparados farmaceuticos. Por último, se determinan las citadas biguanidas en muestras comerciales.
- El estudio crítico - comparativo de las transiciones de color propuestas en las Farmacopeas para la valoración de biguanidas

con ácido perclórico en medio ácido acético, revela que la mayor exactitud corresponde al violeta cristal y violeta de metilo. Por su nitidez son recomendables los dos citados más el verde de malaquita, y no recomendables el O.O Tropaolin y el púrpura de bromocresol.

- Se elaboran y proponen dos nuevos indicadores mixtos de punto gris :

violeta de metilo : amarillo de neozapon : azul de timol

(1,7 : 4,7 : 1)

violeta cristal : amarillo de neozapon : azul de timol

(1 : 11 : 4)

Estos indicadores mixtos mejoran la exactitud y nitidez del viraje con respecto a los correspondientes indicadores simples, como lo demuestran tanto los diagramas $\Delta J/\Delta v$ y $\Delta E^*/\Delta v$ como las valoraciones visuales comparadas sobre disoluciones de metformin.

- La última parte de esta Memoria estudia el sistema verde de bromocresol - clorhexidina en presencia de Triton X-100 y medio tampón succínico-succinato. Se observa la formación de pares iónicos $\text{Big}_2^{2+} \text{VB}^- \text{Cl}^-$ y $\text{Big}_2^{2+} (\text{VB}^-)_2$ en ausencia de triton X-100. Los valores de las constantes de disociación condicionales para las asociaciones 1:1 y 1:2, calculadas a partir de las rectas de Asmus correspondientes son $6,3 \cdot 10^{-5}$ y $8,7 \cdot 10^{-10}$ respectivamente, en presencia de triton.
- La formación del compuesto 1:2 permite la determinación espectrofotométrica directa de clorhexidina en preparados farmaceu-

ticos. Rango óptimo de aplicación $1,48 \cdot 10^{-5}$ - $5,56 \cdot 10^{-5}$ M ,
dsr 0,4 - 1,3 %. No interfieren el ácido ascórbico, ácido
acetilsalicílico, sacarosa y benzocaína aún en un exceso de
100 veces.

- Se lleva a cabo esta determinación espectrofotométrica con técnicas FIA en un montaje monocanal, en el que la biguanida se inserta en la disolución portador-reactivo formada por verde de bromocresol - triton X-100 - tampón succínico/succinato. Las condiciones FIA más adecuadas son 60 microlitros de muestra, velocidad de flujo 3,14 ml/mn y longitud del reactor 92 cm. El producto de reacción en este caso (al contrario del anterior) es el 1:1. Rango óptimo de aplicación $4,05 \cdot 10^{-5}$ - $1,30 \cdot 10^{-4}$, dsr 0,8 % y permite una velocidad de muestreo de 63 muestras/hora. Se estudian la influencia de especies extrañas y la determinación de clorhexidina en el preparado Hibitane 5 % .

II.6.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- P. Rây; Chem. Rev. 1961, 61, 313.
- 2.- D. Sen y C. Sama; J. Indian Chem. Soc. 1977, 54, 127.
- 3.- W. J. Fanshama; J. Org. Chem. 1964, 29, 308.
- 4.- J. C. Gage; J. Chem. Soc. 1949, 221.
- 5.- S. L. Shapiro, W. A. Parrimo y L. Freedman; J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 2220.
- 6.- B. Rathke; Ber. 1879, 12, 776.
- 7.- R. Herth; Wien. Akad. Ber. 1881, 80, 1078.
- 8.- A. Smolka y A. Friedrich; Monastsh. Chem. 1888, 9, 227.
- 9.- A. Ostrogovich; Bul. Soc. Stiinte. Bucareste 1910, 19, 641.
- 10.- R. Parker; Chem. Abs. 1944, 38, 1250.
- 11.- K. H. Slotta y R. Tschesche; Ber. 1929, 62, 1390.
- 12.- American Cyanamid. Co.; Chem. Abs. 1945, 39, 1177.
- 13.- P. Oxley y W. F. Short; J. Chem. Soc. 1951, 1252.
- 14.- K. Shirai y K. Sugino; J. Org. Chem. 1960, 25, 1045.
- 15.- K. Kawano y K. Odo; Chem. Abs. 1962, 56, 3576.
- 16.- K. Kawano, K. Sugino y K. Odo; Chem. Abs. 1961, 55, 1455.
- 17.- G. Cohn; J. Prakt. Chem. 1911, 84, 394.
- 18.- G. Ramis Ramos; Tesis Doctoral 1979.
- 19.- C. García Alvarez-Coque; Tesis Doctoral 1980.
- 20.- R. C. Hirt y R. G. Schmitt; Spectrochim. Acta 1958, 12, 1127.
- 21.- M. Takimoto; Nippon Kagakn. Zasshi 1964, 85, 159.
- 22.- J. Martinez Calatayud, F. Bosch Reig y A. Pastor; Studia Chemica vol. VIII.
- 23.- N. Kundu; J. Indian Chem. Soc. 1953, 30, 627.
- 24.- N. Kundu y P. Rây; J. Indian Chem. Soc. 1952, 29, 811.

- 25.- P. Rây; J. Indian Chem. Soc. 1955, 32, 141.
- 26.- H. Z. Lecher, W. H. Brunner y F. Pum; U.S. Patent
3.119.867 (1964). Chem. Abs. 1964, 60, 14648.
- 27.- Q. Mingoia y P.C. Ferreira; Anais Facultate Farm. Odontol.
Univ. Sao Paulo 1949, I, 43.
- 28.- A. Spinks y M.M. Tuttey; Ann. Trop. Med. Paras. 1946, 40, 101.
- 29.- F. Kurzer; J. Chem. Soc. 1956 K.
- 30.- G. Pellizzari; Atti. accad. Lincei 1921, 301, 224.
- 31.- L. Rosenthaler; Biochem. Z 1929, 207, 298.
- 32.- A.K. De, P.K. Saha y P.K. Das; Indian J. Chem. Sect A 1978,
16, 1045.
- 33.- F. Bosch Reig, J. Martinez Calatayud y M.C. Pascual Marti;
Afinidad, XXXV, 345.
- 34.- L. Tschugaëff; Ber. 1907, 4, 1975.
- 35.- H. Ley y F. Müller; Ber. 1907, 40, 2950.
- 36.- K.H. Slotta y R. Tschesh; Ber. 1929, 62, 1398.
- 37.- P. Rây y H. Saha; J. Indian Chem. Soc. 1941, 18, 609.
- 38.- D. Sen; J. Chem. Soc. 1969, A, 2900.
- 39.- C.R. Saha; J. Inorg. Nucl. Chem. 1976, 38, 1635.
- 40.- T.C. Creets, R. Gsell y D.L. Wampler; Chem. Comm. 1969, 1371.
- 41.- A. Syamal; J. Scient Ind-Res 1978, 37.
- 42.- J. Martinez Calatayud, F. Bosch Reig y M.C. García Alvarez-
Coque. Publ. Universidad de Valencia 1982, 712.
- 43.- N.R. Sengupta y P. Rây; J. Indian Chem. Soc. 1959, 36, 373.
- 44.- J. Martinez Calatayud, P. Campíns Falcó y P. Ibañez Blasco;
Bull. Soc. Chim. Fr 1984, nº 3-4, I-123.
- 45.- C. Gheorghiu y L. Antonescu; An. Univ. Bucuresti. Ser Stiint.
Natur Chim. 1971, 20, 113.

- 46.- S.N. Kazarnouski y N.I. Moschanskaya; Trudygor-Kousk Politekn. Inst. 1955, 11, 62.
- 47.- A.K. Majumdar; J. Indian Chemist. Soc. 1943, 20, 288.
- 48.- P. Spacu y I. Albescu; Acad. Rep. Populare Romine-Studii Cercetari Chim. 1960, 8, 85.
- 49.- F. Capitan y F. Salinas; Bol. Soc. Quim. Perú 1967, 33, 1.
- 50.- J.C. Gage y F.L. Rose; Ann. Trop. Med. Parasitol. 1946, 40, 333.
- 51.- P. Rây y J. Chowdhury; J. Indian Chem. Soc. 1941, 18, 149.
- 52.- A. Bhaduri y P. Rây; J. Indian Chem. Soc. 1945, 22, 229.
- 53.- A. Alessandro, M. Piere y A. Ligouri; G. Med-Mil 1974, 124, 279.
- 54.- G.E. Bailescu, V.V. Cosofret y F.G. Cocu; Talanta 1976, 23, 329.
- 55.- J. Solomon, M. Madgeara y M. Prodescu; Farmacia (Bucharest) 1961, 9, 167.
- 56.- H. Beral, V. Stoicescu y C. Ivan; Farmacia (Bucharest) 1964, 12, 631.
- 57.- A. Spinks y M.M. Tottey; Ann. Trop. Med. Paras. 1946, 10, 101.
- 58.- A.K. Rây; Z. Anal. Chem. 1957, 156, 18.
- 59.- A.K. Rây; Sci. and culture 1954, 19, 568.
- 60.- J. Martinez Calatayud, F. Bosch Reig, P. Fagoaga Caridad y M.C. García Alvarez-Coque.; An. Quim. 1982, 78B, 217.
- 61.- J. Martinez Calatayud, F. Castellano Miralles y P. Campíns Falcó; No publicado.
- 62.- J. Martinez Calatayud, F. Bosch Reig y P. Fagoaga Caridad; Afinidad 1981, XXXVIII, 376.

- 63.- J. Wang; Yaowu Fenxi Zazhi 1984, 4(1), 47.
- 64.- J. Ding; Yaoxue Tongbao 1983, 18(10), 601.
- 65.- S. Pinzauti, G. Papeschi y E. La Porta; J. of Pharm. and Biom. Analysis 1983, 1(1), 47.
- 66.- A.J. Holbrook; J. Pharm. Pharmacol. 1958, 10, 370.
- 67.- A. Spinks y M.M. Tottey; Ann. Trop. Med. Parasitol. 1945, 39, 220.
- 68.- I.V. Chuiko y V.N. Benshtein; Peredovye Metody Khim. Tehnol i Kontiolya Praizv (Rostousk Univ.) Sb 1964, 264.
- 69.- T.P. Owens y L.S. Malowan; Arzneimittel-Forsch 1959, 9, 655.
- 70.- L.G. Chatten y O.K. Okamura; J. Pharm. Sci. 1973, 62, 1328.
- 71.- G. Andermann, M.O. Buhler y M. Erhart; J. Pharm. Sci. 1980, 69, 215.
- 72.- S. Pinzauti, E. La Porta, M. Casini y C. Betti; Pharm. Acta Helv. 1982, 57, 334.
- 73.- J. B. Lowry; J. Pharm. Sci. 1979, 68, 110.
- 74.- Kogyo Kagaku Zasshi; 1960, 63, 1941.
- 75.- J.J. Cincotta y R. Feinland; Anal. Chem. 1962, 34, 774.
- 76.- R.L. Dutta y A. Bhattacharya; J. Indian Chem. Soc. 1975, 52, 1002.
- 77.- B.C. Bag y A. Syamal; J. Indian Chem. Soc. 1970, 47, 475.
- 78.- R.L. Dutta y R.K. Rây; J. Indian Chem. Soc. 1975, 52, 387.
- 79.- O.A. Lake; Pharm. Wekbl Sci. Ed. 1983, 5(1), 15.
- 80.- H. Matsushima y N. Sakurai; Koenshu-Iyo Masu Kenkyukai 1982, 7, 219.
- 81.- H. Matsushima y J. Hajima; Nippon Eiseigaku Zasshi 1982, 37(5), 762.

- 82.- H. Matsushima y K. Sugimoto; Nippon Eiseigaku Zasshi 1982, 37(3), 608.
- 83.- M. Bauer, L. Mailhe y D. Menard; J. Chromatogr. 1983, 259(2), 360.
- 84.- L. Miribel, J.L. Brazier y F. Comat; J. Chromatogr. 1983, 268(2), 321.
- 85.- B. Chakravarty; J. Inorg. Nucl. Chem. 1979, 41(5), 757.
- 86.- B. Chakravarty; J. Inorg. Nucl. Chem. 1979, 41(8), 1211.
- 87.- S. Sengupta y D. Banerjee; J. Indian Chem. Soc. 1976, 53(8), 741.
- 88.- B. Dutta y D. Sen; Indian J. Chem. Sect. A 1980, 19A, 669.
- 89.- D. Sen y C. Saha; J. Chem. Soc. Dalton 1976, 9, 776.
- 90.- B. Dutta y D. Sen; Indian J. Chem. Sect A 1980, 19A, 669.
- 91.- Tesis Doctoral P. Fagoaga Caridad 1983.
- 92.- F. Tomás Vert, F. Vicente Pedrós, J. Martínez Calatayud y V. Peris Martínez; Talanta 1983, 30, 977.
- 93.- A. Pastor García y C. Mongay Martínez. XX Reunión Bienal de la Real Sdad. Española de Química. Castellón 1984.
- 94.- F. Vicente, J. Trijueque y F. Tomás; Química e Industria 1982, 28(9), 619.
- 95.- V.D. Warner, D.M. Lynch y R.S. Ajemian; J. Pharm. Sci. 1976, 65(7), 1070.
- 96.- P.P. Litovchenko; Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1979, 8, 83.
- 97.- R.G. Fischer y R.P. Quintana; J. Dent. Res. 1975, 54(1), 25.
- 98.- D. Wiseman; J. Pharm. Pharmacol. 1964, Suppl 16, 56.
- 99.- V.D. Warner, D.M. Lynch, K.H. Kim y G.L. Grunewald; J. Med. Chem. 1979, 22(4), 359.

- 100.- A.A. Pinkerton y D. Schwarzenbach; J. Chem. Soc. Dalton Trans 1979, 8, 989.
- 101.- R. Benedix, P. Birner y F. Birnstock; J. Mol. Struct. 1979, 51(1), 99.
- 102.- R. Ernst y F.W. Cagle; Acta Cryst. 1977, B33, 235 y 1977, B33, 237.
- 103.- C.J. Brown; J. Chem. Soc. 1967, A1, 60.
- 104.- G. Schwarzenbach, R. Gunt y G. Anderegg; Helv. Chim. Acta 1954, 37, 937.
- 105.- J.M. Amigó, J. Martínez Calatayud y T. Debaerdemaeker; Bull. Soc. Chim. Belges 1985 (en imprenta).
- 106.- M. Litter; Farmacologia 1964, Ed. Ateneo 1310.
- 107.- F. Vicente, J. Trijueque y F. Tomás; J. Pharm. Sci 1983, 72(5), 565.
- 108.- L.M. Scott y G.H. Tomkin; Biochem. Pharmacol. 1983, 32, 827.
- 109.- S.M. Lord y T.W. Atkins; Diabetologie 1983, 25, 108.
- 110.- F. Isnard y J. Lavieuvville; Journ. Ann. Diabetol. Hotel-Dieu 1980, 305.
- 111.- P. Atanasin y E. Nastac; Chem. Abs. 99, 99325.
- 112.- J.E. Fairbrother; The Pharmaceutical Journal 1983, October 29, 513.
- 113.- J.M. Kolthoff y A. Willman; J. Am. Chem. Soc. 1934, 56, 1007.
- 114.- F. Gaslini y L.Z. Nahum; Anal. Chem. 1959, 31, 989.
- 115.- I.M. Kolthoff y P.J. Elving; Treatise on Analytical Chemistry. Part I (1ª edición). vol 4, p 2613.
- 116.- Van Meurs y E.M.F. Dahmen; Anal. Chim. Acta 1958, 19, 64.
1959, 21, 10 y 193. J. Electroanal Chem. 1960, 1, 458.
- 117.- A.A. Maryott; J. Res. Natl. Bur. Stand. 1947, 38, 527.

- 118.- D.B. Bruss y G.A. Harlow; Anal Chem 1958, 30, 1836.
- 119.- M.M. Davis; Acid-Base behaviour in aprotic solvents, Natl. Bur. Stand. (US) Monogr. 105, Washington D.C. 1968.
- 120.- L.W. Marple y G.J. Schappers; Anal. Chem. 1966, 38, 553.
- 121.- J. Coetzee y G.P. Cunningham; J. Am. Chem. Soc. 1965, 87, 2534.
- 122.- I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni y S. Bhowmik; Anal. Chem. 1967, 39, 1627.
- 123.- I.M. Kolthoff; Anal. Chem. 1974, 46, 1992.
- 124.- M.G. Mellon; "Analytical Absorption Spectroscopy" Wiley, New York 1950.
- 125.- Proceedings Eighth Session, Commission Internationale de l'Eclairage; Cambridge, England, pp 19-29, Setiembre 1931.
- 126.- D.L. MacAdam; J. Opt. Soc. Am. 1942, 32, 247.
- 127.- F.C. Brekenridge y W.R. Schub; J. Opt. Soc. Am. 1939, 29, 370.
- 128.- CIE, Comptes Rendus, Brussels; June 1959 vol A, 37.
- 129.- Committee TC-1.3 CIE; J. Opt. Soc. Am. 1974, 64, 896.
- 130.- M.C. Pascual Martí. Tesis Doctoral Valencia 1983.
- 131.- J. Cacho y C. Nerin; Anal Chem 1982, 54, 1446.
- 132.- V.M. Bhuchar y A.K. Agrawal; Analyst 1982, 107, 1439.
- 133.- J. Martinez Calatayud y M.C. Pascual Martí; Analisis 1984, 12, 409.
- 134.- J. Martinez Calatayud, M.C. Pascual Martí y S. Sagrado Vives; Analisis 1985, 13, 87.
- 135.- J. Martinez Calatayud, M.C. Pascual Martí y S. Sagrado Vives; Analyst (en prensa).
- 136.- E. Bosch, E. Casassas, A. Izquierdo y M. Rosés ; Anal. Chem. 1984, 56, 1422.

- 137.- V.M. Bhuchar y A.K. Agrawal; Indian J. Chem. Sect A 1984, 23A, 262.
- 138.- P. Bakos, G. Verzar Petri y G. Lukacs; HSI, Hung. Sci. Instrum. 1981, 52, 15.
- 139.- S. Yoshida, K. Oda y S. Hirose; Yakugaku Zasshi 1982, 102, 440.
- 140.- S. Yoshida, K. Oda y S. Hirose ; Bunseki Kagaku 1981, 30, 443.
- 141.- S. Yoshida, K. Oda y S. Hirose; Chem. Pharm. Bull. 1981, 29, 1662.
- 142.- Flow injection analysis. Tecator A.B. Box 70, S-263 01 Sweden August 1983.
- 143.- M. Valcarcel y M.D. Luque de Castro; Quim. An. 1982, 1, 201.
- 144.- J. Martinez Galatayud. Die Pharmazie (En prensa).
- 145.- V.V.S. Eswara Dutt y H.A. Mottola; Anal. Chem. 1977, 49, 776.
- 146.- J.B. Landis; Anal. Chim. Acta 1980, 114, 155.
- 147.- B. Karlberg y S. Thelander; Anal. Chim. Acta 1978, 98, 1.
- 148.- F.H. Bergamin, J.X. Madeiros, B.F. Reis y E.A.G. Zagatto; Anal. Chim. Acta 1978, 101, 9.
- 149.- B. Karlberg, P.A. Johansson y S. Thelander; Anal. Chim. Acta 1979, 104, 21.
- 150.- L. Fossey y F.F. Cantwell; Anal. Chim. 1982, 54, 1693.
- 151.- J. M. Miller; Anal. Procd. 1981, 18, 264.
- 152.- L. Nord y B. Karlberg; Anal. Chim. Acta 1980, 118, 285.
- 153.- L. Fossey; y F.F. Cantwell; Anal. Chem. 1983, 55, 1882.
- 154.- M. Strandberg y S. Thelander; Anal. Chim. Acta 1983, 145, 219.
- 155.- D. Batteridge, J.S. Sly y A.P. Wade; Anal. Chem. 1983, 55, 1292.
- 156.- A.P. Wade; Anal. Procd. 1983, 20, 108.

- 157.- V. Pacakova; Anal. Chim. Acta 1984, 159, 71.
- 158.- G. Decristoforo y B. Danielsson; Anal. Chem. 1984, 56, 263.
- 159.- B. Karlberg y S. Thelander; Anal. Chim. Acta 1980, 114, 129.
- 160.- G.L. Abdullari, J.N. Miller, H.N. Sturley y J.W. Bridges;
Anal. Chim. Acta 1983, 145, 109.
- 161.- J.N. Miller; Anal. Procd. 1981, 18, 264.
- 162.- J. L. Burguera, M. Burguera y A. Townshend; Rev. Roum. Chim.
1982, 27, 879.
- 163.- J.J. Donkerbrock, A.C. Veltkamp, G. Gooijer, N.H. Velthorst
y B.W. Frei; Anal. Chem. 1983, 55, 1886.
- 164.- H.K. Chan y A.G. Fogg; Anal. Chim. Acta 1979, 111, 281.
- 165.- U. Forsman y A. Karlsson; Anal. Chim. Acta 1982, 139, 133.
- 166.- B. Persson y L. Rosen; Anal. Chim. Acta 1981, 123, 115.
- 167.- L. Wang y B.A. Freiha; Anal. Chem. 1983, 55, 1285.
- 168.- J. Wang y H.D. Dewald; Talanta 1984, 31, 387.
- 169.- J. Wang y B.A. Freiha; Anal. Chim. Acta 1983, 151, 109.
- 170.- R. Egli y R. Asper; Anal. Chim. Acta 1978, 101, 253.
- 171.- A.N. Strol y D.J. Curran; Anal. Chem. 1979, 51, 1045.
- 172.- D.J. Curran y T.P. Tougas; Anal.Chem. 1984, 56, 672.
- 173.- H. Lundbäck, G. Johansson y O. Holst; Anal. Chim. Acta.1983,
155, 47.
- 174.- T. Yao; Anal. Chim. Acta 1983, 153, 175.
- 175.- T. Yao, Y. Kobayashi y M. Sato; Anal. Chim. Acta 1983, 153
337.
- 176.- B. Karlberg y S. Thelander; Analyst 1978, 103, 1154.
- 177.- K. Yasuda, H. Miyagi, Y. Hamada y Y. Yakata; Analyst 1984,
109, 61.

- 178.- E. Pungor, Z. Feher, G. Nagy y K. Toth; CRC Critical Reviews in Anal. Chem. 1983, 14, 1.
- 179.- P. Roehring; Anal. Chím. Acta 1983, 153, 181.
- 180.- J.C. Rossotti y H. Rossotti. The determination of stability constants, McGraw, New York 1961.
- 181.- J.C. Speakman; J. Chem. Soc. 1940, p 855.
- 182.- British Pharmacopoeia; 1980, I, 100.
- 183.- C. Liteanu y D. Cormos; Talanta 1960, 7, 18.
- 184.- J. Vestral y S. Kotrly; Talanta 1970, 17, 151.
- 185.- C.N. Reilley y E.M. Smith; Anal. Chem. 1960, 32, 1233.
- 186.- E. Bishop; Indicators. Pergamon Press 1972.
- 187.- J.S. Coleman, L.P. Varga y S.H. Mastin; Inorg. Chem. 1970, 9, 1015.
- 188.- E. Asmus; Z. Anal. Chem. 1960, 178, 104.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. ª Pilar Campins Faleó

la calificación de Apto "Cum Laude"

Valencia, a 27 de Junio de 1985

El Secretario,

El Presidente



Maid. Giménez