

Capítulo 5.

Determinación de constantes de ionización

Se determinaron las constantes de ionización de diversos compuestos mediante curvas de titulación ácido-base empleando métodos espectrofotométricos (titulación espectrofotométrica). En la mayor parte de los casos estudiados, las constantes de ionización son constantes de disociación de grupos ácidos. La técnica empleada se basa, fundamentalmente, en el análisis de la variación del espectro de absorción de una solución de la sustancia estudiada cuando se cambia el pH de la misma sin cambiar su concentración. En este capítulo se expondrán los detalles técnicos de este procedimiento experimental.

5.1. Preparación de las soluciones

Las soluciones se prepararon pesando cantidades calculadas de las sustancias cuyas constantes de ionización se quieren determinar y luego disolviéndolas en soluciones acuosas de Na(OH) diluida. Esto favorece la disolución, ya que en medio alcalino, el ácido fólico y las pterinas presentan grupos ionizados. Posteriormente, se ajusta el pH de la solución en aproximadamente 11, mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución de Na(OH) 0,5 M y, por último, se lleva al volumen final mediante el empleo de matraces.

La concentración se ajustó de manera tal que la absorbancia de las soluciones fuera adecuada para realizar las medidas en el espectrofotómetro. Típicamente, se prepararon soluciones de concentración 100 μ M, que permiten obtener absorbancias, para las zonas del espectro donde se producen los cambios espectrales (200-500 nm), comprendidas en el rango 0,1-1,5.

5.2. Procedimiento de la titulación.

5.2.1. Preparación de la solución correspondiente a cada pH.

Se preparó una solución de la sustancia a estudiar por pesada, como se explicó en el apartado anterior (5.1) (solución madre). Mediante el agregado de pequeños volúmenes de soluciones acuosas de Na(OH) y/o HCl se fue ajustando el pH a los valores deseados. Para realizar esta operación se prepararon, por pesada, soluciones de Na(OH) de distintas concentraciones (5M; 0,5M y 0,05M). Se empleó Na(OH) en granallas, provisto por Merck y, las soluciones resultantes no fueron tituladas, pues esta operación no es necesaria a los fines de este trabajo. Por su parte, se prepararon soluciones de HCl a partir de solución concentrada comercial provista por Merck. Las concentraciones de estas soluciones, fueron similares a las de Na(OH) y tampoco se titularon para conocer con mayor exactitud su concentración.

Se tomaron alícuotas de entre 20 y 50 ml de la solución madre. El ajuste final de pH se realizó agregando pequeños volúmenes de las soluciones de HCl o Na(OH). En todos los casos este agregado se realizó empleando micropipetas, siendo los volúmenes adicionados menores al 0,5% del volumen de la alícuota. Teniendo en cuenta esta condición, puede considerarse que el aumento del volumen, al fijar el pH de la solución, es despreciable y, por ende, la concentración no varía respecto a la solución madre. Una vez alcanzado el pH deseado se tomó el espectro de absorción de la solución.

Repitiendo este procedimiento se modificó nuevamente el pH de la alícuota hasta alcanzar otro pH y se tomó el espectro de la solución. Se trabajó sobre la misma alícuota en tanto y en cuanto el volumen total agregado nunca sobrepase la condición fijada del 0,5 % del volumen inicial. De lo contrario, se descartó la alícuota con la cual se estaba trabajando y se tomó una nueva y se repitió la operación. De esta manera, mediante el agregado de las soluciones de distinta concentración de ácido y base, se logra modificar el pH de la solución en un amplio rango sin modificar la concentración de la sustancia cuya constante de ionización se quiere determinar.

5.2.2. Equipamiento.

Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro Metrhom, provisto de un electrodo de vidrio combinado. La calibración del equipo se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00; 7,00; 10,00 y 12,00.

Los espectros de absorción, correspondientes a las soluciones preparadas como se detalló en el inciso anterior, fueron tomados en un espectrofotómetro Cary 3 de Varian. Este equipo, que permite tomar espectros de absorción en el rango comprendido entre 190 y 900 nm, es un espectrofotómetro de barrido de doble haz, que cuenta con un programa de computación que admite guardar las señales obtenidas y promediarlas, en aquellos casos en los cuales la relación señal-ruido no es aceptable, para lograr espectros suaves.

En todos los casos, se empleó como blanco una solución de agua (mili Q) y se grabaron los espectros entre 200 y 500 nm. Para casi todas las medidas, se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Cuando fue necesario, por emplearse concentraciones mayores a la habitual (100 μM), se recurrió al uso de celdas de 2 mm de camino óptico.

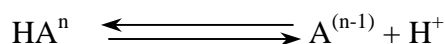
5.2.3. Titulación espectrofotométrica.

Se registraron los espectros de absorción de las soluciones preparadas. Luego, para cada caso, se determinaron las zonas del espectro donde se producían los mayores cambios en la absorbancia de las soluciones al variar el pH. También se analizaron los puntos isobésticos con el fin de evaluar la cantidad de formas ácido-base presentes en el rango de pH estudiado.

Se realizaron las correspondientes gráficas de absorbancia en función del pH a distintas longitudes de onda, las cuales se escogieron dentro de las zonas de mayor cambio de absorbancia. En la figura 5.1 se muestra una gráfica típica.

5.3. Análisis de los resultados

Es conveniente, antes de desarrollar esta sección, realizar una aclaración sobre la terminología que será empleada en este trabajo de tesis respecto a los equilibrios ácido-base. Las “formas ácido-base” de una sustancia son especies químicas que difieren entre sí en la carga neta de la molécula en una unidad. A la de mayor carga se la llamará, en adelante, “forma ácida” (AH^n) y a la de menor carga se la denominará “forma alcalina” ($\text{A}^{(n-1)}$). Obviamente, la primera posee un hidrógeno más que la segunda en el grupo ionizable y el equilibrio entre ambas puede representarse mediante la siguiente reacción.



La constante de equilibrio de esta reacción (constante de ionización o constante de disociación ácida) viene dada por la siguiente expresión

$$K_a = [H^+] \cdot [A^{(n-1)}] / [HA^n]$$

5.3.1. Determinación de la constante de ionización mediante un ajuste no lineal.

Sobre consideraciones sencillas basadas en el equilibrio entre dos formas ácido-base de una sustancia puede deducirse una ecuación que vincula la absorbancia de la solución, a determinada longitud de onda, con el pH. A continuación se muestra la ecuación empleada y en la sección siguiente se muestra su deducción.

$$A_T = 10^{-4} \cdot \{ b + (a - b) \cdot [K_a / (K_a + 10^{(-X)})] \} \quad (1)$$

donde A_T es la absorbancia de la solución a una dada longitud de onda; a y b son los coeficientes de extinción molar, a dicha longitud de onda, de las formas alcalina y ácida respectivamente; K_a es la constante de ionización del compuesto y x el pH.

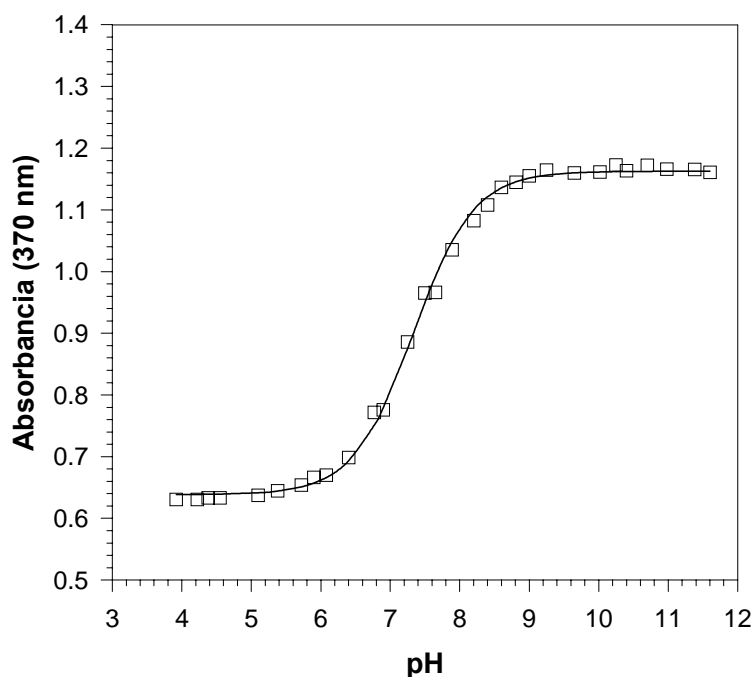


Figura 5.1. Curva de titulación obtenida para 6-formilpterina. Las medidas de la absorbancia fueron realizadas a 370 nm. La línea continua muestra la absorbancia calculada a partir del ajuste no lineal realizado empleando la ecuación 1.

El ajuste no lineal se realizó empleando el programa SigmaPlot, obteniéndose los valores calculados para los parámetros a , b y K_a . En todos los casos se compararon estos

valores con los obtenidos mediante el método gráfico. En este último método, los valores de a y b se calculan a partir de las asíntotas de la gráfica y K_a es igual al valor de pH que corresponde a la absorbancia obtenida promediando los valores de absorbancia de las asíntotas.

5.3.2. Deducción de la ecuación (1).

Esta ecuación permite plantear la absorbancia total de la solución (A_T), a una determinada longitud de onda, como una función del pH. Considerando que las únicas especies que absorben luz en la región del espectro analizada son las formas ácida y básica de la molécula cuya constante de ionización se quiere averiguar, se pueden plantear las siguientes ecuaciones.

$$A_{HA} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] \quad (2)$$

$$A_{A^-} = \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (3)$$

$$A_T = A_{HA} + A_{A^-} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (4)$$

Por razones de comodidad se usará HA para representar a la forma ácida y A^- para representar a la forma alcalina. Por consiguiente A_{HA} y A_{A^-} son las absorbancias de las formas ácida y alcalina respectivamente, ϵ_{HA} y ϵ_{A^-} son los coeficientes de extinción molar de las formas ácida y alcalina, respectivamente y, por último, $[HA]$ y $[A^-]$ son las correspondientes concentraciones molares. Como se mencionó anteriormente la expresión para la constante de ionización (K_a) es:

$$K_a = [H^+] \cdot [A^-] / [HA] \quad (5)$$

Además se define la concentración total o analítica (C) como la suma de las concentraciones de las dos formas ácido-base.

$$C = [HA] + [A^-] \quad (6)$$

despejando $[HA]$ de (6) y reemplazándolo en (4) se obtiene

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - [A^-]) + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (7)$$

despejando $[HA]$ de (6), reemplazándolo en (5) y luego despejando $[A^-]$ se obtiene una expresión que relaciona $[A^-]$ y C .

$$[A^-] = C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (8)$$

reemplazando esta expresión (8) en (7) se obtiene

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - C \cdot K_a / (K_a + [H^+])) + \epsilon_{A^-} \cdot C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (9)$$

reordenando,

$$A_T = C [\epsilon_{HA} \cdot (1 - K_a / (K_a + [H^+])) + \epsilon_{A^-} \cdot K_a / (K_a + [H^+])] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow A_T = C [\epsilon_{HA} - \epsilon_{HA} \cdot K_a / (K_a + [H^+]) + \epsilon_{A^-} \cdot K_a / (K_a + [H^+])] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow A_T = C [\epsilon_{HA} + (\epsilon_{A^-} - \epsilon_{HA}) \cdot K_a / (K_a + [H^+])] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow A_T = C [\epsilon_{HA} + (\epsilon_{A^-} - \epsilon_{HA}) \cdot K_a / (K_a + 10^{-pH})] \quad (10)$$

reemplazando en la ecuación (10) C por 10^{-4} , que es la concentración que se usó en las titulaciones, ϵ_{HA} por a, ϵ_{A^-} por b y pH por X, se llega a la ecuación (1).