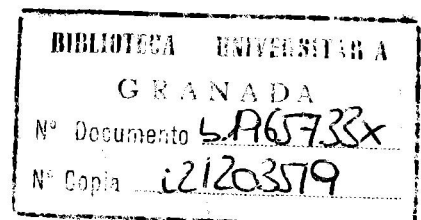


UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 30-5-70  
ENTRADA NUM. 837

T  
12  
68

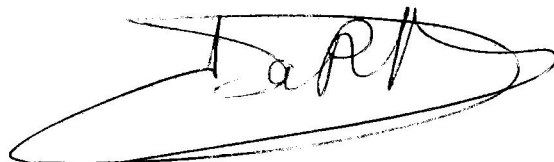
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

CINETICA Y EQUILIBRIO DE  
FORMACION DE BASES DE SCHIFF  
DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL  
EN MEZCLAS AGUA-DIOXANO



*Isabel María Plaza del Pino*

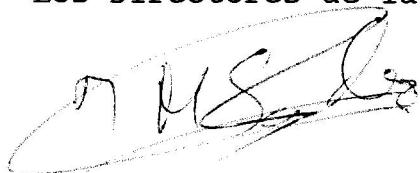
Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en  
Ciencias, Sección de Químicas



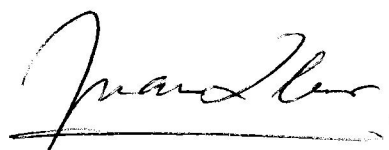
Fdo: ~~Isabel María Plaza del Pino~~, Licenciada en  
Ciencias, Sección de Químicas.

Visado en Granada a 28 de Mayo de 1990.

Los Directores de la Tesis:



Fdo: Jose M. Sánchez Ruiz  
Profesor Titular  
de Química Física  
Universidad de Granada



Fdo: Juan Llor Esteban  
Catedrático  
de Química Física  
Universidad de Granada

*A mis padres.*

Cuando se da por terminada una Tesis Doctoral y "agobios" y "neuras" empiezan a ceder se produce un sentimiento común en los que se encuentran en este "trance": agradecer a una serie de personas su colaboración para que el trabajo haya llegado a su fin. Esta es la sensación que ahora tengo y, por lo tanto, quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros de Departamento por la colaboración que cada uno me ha prestado: dirigiendo y orientando este trabajo, solucionando problemas técnicos e informáticos, ayudando en los "trabajos manuales" de última hora, etc... y, por encima de todo, por su amistad y por animarme a seguir adelante en los peores momentos.

También quiero agradecer a mis amigos del barrio y, especialmente, a Domingo, por su continuo apoyo y por ayudarme siempre a relativizar los problemas y a darle importancia sólo a lo importante. Sin ellos en más de una ocasión (y de dos) habría tirado la toalla, y ellos lo saben.

Y por último, pero no por ello en segundo plano, quiero dar las gracias a mis padres y a mis hermanos porque han sabido siempre estar ahí ofreciéndome su apoyo y su cariño.

*"La ciencia es una estrategia,  
es una forma de atar la verdad  
que es algo más que materia  
pues el misterio se oculta detrás."*

L. E. Aute.

## INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	9
2. 1. Materiales.....	11
2. 2. Instrumentos.....	15
2. 3. Medida del pH en mezclas agua-dioxano.....	17
3. DETERMINACION DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE IONIZACION DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL.....	23
3. 1. Fundamento teórico.....	25
3. 2. Procedimiento experimental.....	33
3. 3. Análisis de datos.....	35
3. 4. Resultados.....	39
4. DETERMINACION DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE IONIZACION Y DE FORMACION DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL Y N-HEXILAMINA.....	55
4. 1. Determinación potenciométrica de constantes de equilibrio de ionización y de formación de la base de Schiff del 5'-fosfato de piridoxal y n-hexilamina.....	57
4. 1. 1. Fundamento teórico.....	57
4. 1. 2. Procedimiento experimental.....	68

4. 1. 3. Análisis de datos.....	69
4. 1. 4. Resultados.....	73
4. 2. Determinación espectrofotométrica de la constante de equilibrio de ionización $K_{3b}$ de la base de Schiff del 5'fosfato de piridoxal y n-hexilamina.....	119
4. 2. 1. Fundamento teórico.....	119
4. 2. 2. Procedimiento experimental.....	126
4. 2. 3. Análisis de datos.....	127
4. 2. 4. Resultados.....	137
5. CINETICA DE FORMACION E HIDROLISIS DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL Y N-HEXILAMINA.....	155
5. 1. Fundamento teórico.....	157
5. 2. Procedimiento experimental.....	165
5. 3. Análisis de datos y resultados.....	172
6. CINETICA DE FORMACION E HIDROLISIS DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL Y N-HEXILAMINA A PARTIR DE DATOS POTENCIOMETRICOS.....	193
7. DISCUSION.....	219
8. CONCLUSIONES.....	271
BIBLIOGRAFIA.....	275
APENDICE I.....	289

**APENDICE II.....297**

**GLOSARIO DE SIMBOLOS.....317**



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>	<b>Figura</b>	<b>Página</b>
2.1.....	21	21.....	83
1.....	41	22.....	86
2.....	42	23.....	89
3.....	43	24.....	92
4.....	44	25.....	95
5.....	46	26.....	100
6.....	47	27.....	103
7.....	48	28.....	106
8.....	49	29.....	109
9.....	50	30.....	110
10.....	51	31.....	111
11.....	52	32.....	112
12.....	53	33.....	113
13.....	54	34.....	114
14.....	76	35.....	115
15.....	77	36.....	116
16.....	78	37.....	117
17.....	79	38.....	118
18.....	80	39.....	128
19.....	81	40.....	129
20.....	82	41.....	130

42.....131  
43.....138  
44.....139  
45.....140  
46.....141  
47.....144  
48.....145  
49.....146  
50.....147  
51.....148  
52.....149  
53.....150  
54.....151  
55.....154  
56.....167  
57.....168  
58.....169  
59.....170  
60.....173  
61.....174  
62.....175  
63.....176  
64.....177  
65.....178  
66.....179  
67.....180  
68.....186

69.....191  
70.....196  
71.....204  
72.....205  
73.....206  
74.....207  
75.....210  
76.....211  
77.....212  
78.....213  
79.....214  
80.....215  
81.....216  
82.....217  
83.....225  
84.....226  
85.....227  
86.....228  
87.....229  
88.....230  
89.....231  
90.....232  
91.....233  
92.....234  
93.....243  
94.....247  
95.....251

96.....	253	101.....	263
97.....	254	102.....	264
98.....	255	103.....	266
99.....	257	104.....	269
100.....	258	I.....	295

### INDICE DE TABLAS

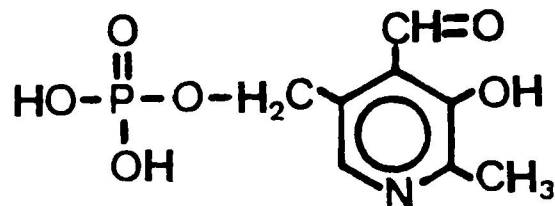
Tabla	Página	Tabla	Página
1.....	40	6.....	237
2.....	74	7.....	238
3.....	143	8.....	239
4.....	190	I.....	294
5.....	236		

### INDICE DE ESQUEMAS

Esquema	Página	Esquema	Página
1.....	26	7.....	121
2.....	27	8.....	136
3.....	38	9.....	182
4.....	59	10.....	187
5.....	60	11.....	244
6.....	72	12.....	245

## 1. INTRODUCCION

El 5'-fosfato de piridoxal (PLP) es el derivado bioquímicamente activo de la Vitamina B<sub>6</sub>:



PLP

El PLP interviene como coenzima en numerosas reacciones del metabolismo de los aminoácidos tales como transaminación, racemización,  $\alpha$ - $\beta$  eliminación, desplazamiento  $\beta$ , descarboxilación, etc. (Snell et al., 1963 y 1968; Strausbauch y Fischer, 1970; Cortijo et al., 1971; Snell y Haskel, 1971; Snell, 1985). También interviene en el metabolismo del glucógeno como coenzima de la fosforilasa (Baranowski et al., 1957; Helmreich y Klein, 1980; Madsen y Withers, 1986; Johnson et al., 1987). En todos los casos, el PLP se encuentra en el sitio activo de las enzimas correspondientes formando una base de Schiff con el grupo  $\epsilon$ -amino de un resto de lisina.

Se sabe, desde los trabajos de Snell (1945) y Metzler y Snell (1952) que el PLP (al igual que sustancias relacionadas, como el piridoxal) es capaz de catalizar, en ausencia completa de enzimas,

una gran variedad de reacciones de los aminoácidos idénticas a las catalizadas por las enzimas dependientes del fosfato de piridoxal (para una revisión, ver Martell, 1982) aunque, desde luego, la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente es mucho mayor.

Resulta obvio, por tanto, que el PLP es la parte esencial del sitio activo de las enzimas dependientes de la Vitamina B<sub>6</sub>, lo que explica el gran número de trabajos de índole quimicofísica publicados sobre el PLP y sustancias relacionadas (ver, por ejemplo, Nagano y Metzler, 1967; Siano y Metzler, 1969; Bazhulina et al., 1970 y 1974; Arrio-Dupont, 1970; Metzler et al., 1973; Seliskar, 1974 y 1977; Witherup y Abbot, 1975; Harruff y Jenkins, 1976; Harris et al., 1976; Jo et al., 1977; Metzler et al., 1977 y 1980) destinados a obtener la información básica sobre estas moléculas necesaria para comprender los mecanismos enzimáticos.

Hasta principios de los años ochenta, la mayoría de los trabajos quimicofísicos realizados sobre el PLP y sustancias relacionadas lo fueron en disolución acuosa (referencias citadas en el párrafo anterior), ya que éste es el medio en que las enzimas se encuentran naturalmente disueltas. Existe evidencia, sin embargo, de que los sitios de unión del PLP en algunas enzimas presentan una polaridad menor que la del agua (Shaltiel y Cortijo, 1970; LLor y Cortijo, 1977; Kallen et al., 1985), por lo que parece aconsejable extender a medios de baja polaridad los estudios quimicofísicos previamente realizados en disolución acuosa. En este sentido, el grupo de investigación del Departamento de Química Física de la Universidad de Granada ha llevado a cabo en los últimos años un estudio exhaustivo de las

propiedades del PLP y sustancias relacionadas en mezclas agua-dioxano (Llor et al., 1984; Sánchez-Ruiz et al., 1984a, 1984b y 1984c ; Cortijo y Sánchez-Ruiz, 1984; Sánchez-Ruiz et al., 1985, 1986 y 1987; Asensio et al., 1987; Llor et al., 1988; Cortijo et al., 1988; Llor et al., 1989a, 1989b y 1989c). Como parte de este estudio se investigaron los equilibrios de ionización tautomerización e hidratación de las siguientes sustancias: PLP, piridoxal, 5'-deoxipiridoxal, piridoxina, 3-hidroxipiridina, 4-piridincarboxaldehído, salicilaldehído, piridina y fenol; es decir, además del coenzima mismo (PLP) se estudiaron una serie de compuestos que poseen alguno o algunos de los grupos funcionales que caracterizan a la Vitamina B<sub>6</sub>. Se encontró (Sánchez-Ruiz et al., 1984a; Cortijo et al., 1988) que los efectos de sustituyente y disolvente sobre las constantes de ionización microscópicas (unas 300, en total) de estos compuestos en mezclas agua-dioxano (desde agua pura a 70 % en volumen de dioxano) podían explicarse conjuntamente mediante una ecuación general basada en la relación lineal de energía libre de Hammett y en el modelo de Marshall (Quist y Marshall, 1968a y 1968b; Marshall, 1970), el cual predice que los valores de pK varían linealmente con el logaritmo de la concentración molar de agua en el medio. Esta ecuación general pudo utilizarse (Cortijo et al., 1988) para demostrar la extrema improbabilidad de una transferencia protónica entre el grupo 5'-fosfato y la base de Schiff formada entre el grupo aldehído del PLP y el resto de lisina-258 en el sitio activo de la aspartato aminotransferasa, la cual había sido propuesta anteriormente por Arnone et al. (1985).

La etapa siguiente, dentro de esta línea de investigación,

consiste obviamente en el estudio (tanto desde el punto de vista de equilibrio, como del cinético) de las bases de Schiff formadas por el PLP (y sustancias relacionadas) con aminas y aminoácidos. Las razones son las siguientes:

1) El PLP se encuentra en el sitio activo de las enzimas dependientes de la Vitamina B<sub>6</sub> formando una base de Schiff con el grupo ε-amino de un resto de lisina. Por lo tanto, las propiedades de ionización y tautomerización de bases de Schiff del PLP son, posiblemente, más relevantes que las del coenzima libre, al menos en lo que se refiere a la comprensión de los mecanismos de acción enzimática.

2) La primera etapa en las reacciones del metabolismo de los aminoácidos catalizadas por enzimas dependientes de la Vitamina B<sub>6</sub> es una transaminación (Metzler, 1981; Arnone et al., 1985); es decir la rotura de la base de Schiff formada entre el PLP y el resto de lisina y la formación consiguiente de una nueva base de Schiff con el sustrato aminoácido. De aquí el interés de conocer los factores fundamentales que afectan el equilibrio y la cinética de formación e hidrólisis de bases de Schiff del PLP.

Un estudio sistemático de la cinética y equilibrio de formación de bases de Schiff del PLP (y sustancias relacionadas) con diversas aminas y aminoácidos y en diferentes disolventes (por ejemplo, mezclas agua-dioxano) requiere, como etapa previa, el desarrollo de métodos experimentales que permitan obtener la información deseada y que posean las siguientes características:

a) Deben ser métodos rápidos, dado que el estudio propuesto implicaría un gran número de sistemas en diferentes disolventes.

b) El PLP presenta especies iónicas con carga -2 y -3, por lo

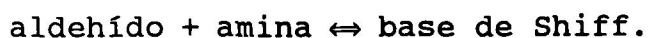


que la probabilidad de asociaciones iónicas es muy grande en medios de baja polaridad (mezclas agua-dioxano con alto contenido en dioxano, por ejemplo); por lo tanto, se hace necesario trabajar con fuerzas iónicas bajas y, a ser posible, tener en cuenta (aunque sólo sea de forma aproximada) las desviaciones de la idealidad, mediante el uso de estimaciones razonables de los coeficientes de actividad relevantes.

c) Debe evitarse el uso de tampones, en primer lugar, debido a que ello implicaría una alta fuerza iónica y, en segundo, a que sería necesario, en los experimentos cinéticos, estudiar de forma sistemática la posible catálisis general por parte de los iones del tampón, lo cual aumentaría considerablemente el número de medidas a realizar.

El objetivo fundamental de este trabajo es el desarrollo, tanto desde el punto de vista experimental como del de análisis de datos, de métodos que reúnan las características que acabamos de exponer.

Así, hemos puesto a punto un método potenciométrico que permite determinar, de una forma relativamente rápida, las constantes de ionización y las constantes de equilibrio de formación de bases de Schiff (sección 4. 1.). El método se basa en la valoración potenciométrica del sistema en equilibrio:



Por lo que respecta a la determinación de las constantes cinéticas de formación e hidrólisis de bases de Schiff, el procedimiento habitual consiste en la obtención de una serie de valores de la constante aparente de pseudo-primer orden al mismo pH y a diferentes concentraciones de amina (ver Sánchez-Ruiz et

al., 1982; ver, también, la sección 5), obteniéndose los valores de  $k_1$  (constante cinética de formación de base de Schiff) y  $k_2$  (constante cinética de hidrólisis de la base de Schiff) a partir de la dependencia de la constante de pseudo-primer orden con la concentración de amina (por supuesto, este procedimiento debe repetirse a diferentes valores de pH para obtener finalmente los perfiles  $k_1/\text{pH}$  y  $k_2/\text{pH}$ ). Este método de análisis de datos, sin embargo, no resulta adecuado cuando se trabaja en ausencia de tampón, debido a la dificultad de llevar a cabo varios experimentos cinéticos a exactamente el mismo valor de pH. Por lo tanto, en la sección 5 desarrollamos un método diferente de análisis que no requiere la reproducibilidad en los valores de pH, pero que permite obtener, igualmente, los perfiles  $k_1/\text{pH}$  y  $k_2/\text{pH}$ .

Esta metodología se aplicará al sistema:



en mezclas agua-dioxano, sistema sobre el que el grupo posee alguna información previa en disolución acuosa (Sánchez-Ruiz et al., 1982; Llor et al., 1984).

## 2. MATERIALES Y METODOS



## 2. 1. MATERIALES.

1,4-Dioxano (Ferosa Técnico). Se purificaba con el siguiente procedimiento: Se mantenía a reflujo con un 10% en peso de ácido clorhídrico concentrado durante tres horas bajo una ligera corriente de nitrógeno, se separó la fase acuosa y se agitó la fase orgánica con lentejas de KOH. El líquido limpio sobrenadante se mantenía a reflujo con sodio durante 10 a 12 horas, también bajo ligera corriente de nitrógeno, se rectificaba y se guardaba congelado a 4 °C, bajo nitrógeno y en la oscuridad.

Las características espectroscópicas del dioxano dependen marcadamente de su pureza; el purificado por nosotros era totalmente transparente por encima de 300 nm, y presentaba transmitancias (medidas en células de 1 cm de espesor frente a agua como referencia) de 90% a 270 nm y 70% a 250 nm, que son superiores a las de los dioxanos comerciales para espectroscopía ultravioleta. Por otro lado, su punto de corte, es decir, la longitud de onda a la cual la sustancia presenta absorbancia 1 medida en célula de 1 cm de espesor frente a agua como referencia, era inferior a 220 nm.

Clorhidrato de n-hexilamina sólido. Se sintetizaba el clorhidrato en estado sólido a partir de n-hexilamina (Jansen) mediante el siguiente procedimiento: una disolución de n-hexilamina se neutralizaba con ácido clorhídrico y se llevaba

casi a sequedad. El sólido formado se tenía en un desecador con  $P_2O_5$  a vacío durante 24 horas para conseguir sequedad total. A continuación se disolvía en cloroformo y se recristalizaba con acetato de etilo. El producto sólido se secaba y se mantenía constantemente en un desecador con  $P_2O_5$ .

Ftalato ácido de potasio (Merck, para análisis). Se secó en estufa a  $110^\circ C$  durante 24 horas antes de utilizarlo y se mantuvo en un desecador con  $P_2O_5$ .

Agua. El agua utilizada en todos los experimentos fué previamente destilada y posteriormente desionizada con una resina de intercambio iónico. Inmediatamente antes de su utilización se desgasificaba.

Los siguientes productos se utilizaron sin ningún tratamiento previo:

5'-Fosfato de piridoxal (Merck).

n-Hexilamina (Jansen).

Hidroxido potásico (Merck, disolución acuosa al 30% libre de carbonatos).

Acido clorhídrico (Carlo Erba, disolución acuosa al 37 %).

Cloruro potásico (Merck, para análisis).

Hidróxido sódico (Merck, para análisis).

#### PREPARACION DE DISOLUCIONES.

5'- Fosfato de piridoxal. (PLP). La disolución madre se preparaba a partir del producto sólido diariamente y se mantenía en atmósfera inerte de nitrógeno en completa oscuridad. La concentración de esta disolución se determinaba diluyendo un volumen exactamente conocido de disolución madre en 2 mls de disolución de NaOH 0.1 M y se medía la absorbancia a 388 nm,  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Peterson y Sober, 1954). En los experimentos de las secciones 3. y 4. 1. (determinación potenciométrica de constantes de ionización del PLP y de ionización y de formación de la base de Schiff, respectivamente) se efectuaba una determinación adicional de la concentración a partir la valoración del PLP con KOH. En todos los casos se comprobó que la diferencia entre las concentraciones determinadas de esta forma y espectrofotométricamente era inferior al 1%; en el análisis posterior de datos de estas secciones se utilizó el valor de concentración determinado potenciométricamente.

n-Hexilamina. Se preparaba una disolución madre por dilución del volumen adecuado e inmediatamente se titulaba con HCl para determinar su concentración (tres valoraciones) (sección 4. 2.). Se mantenía bajo atmósfera de nitrógeno.

Clorhidrato de n-hexilamina. Las disoluciones madre de

clorhidrato se preparaban de dos formas:

a) Por pesada directa del sólido y dilución a volumen adecuado (sección 5). Se mantenía bajo atmósfera de nitrógeno.

b) Añadiendo a una disolución madre de n-hexilamina (preparada como se ha indicado anteriormente) la cantidad equimolecular de HCl (secciones 3. y 4. 1.). Se mantenía bajo atmósfera de nitrógeno.

Hidróxido potásico. La disolución se preparó a partir de la disolución acuosa al 30% libre de carbonatos por pesada directa, se determinó su concentración mediante titulación con ftalato ácido de potasio (tres valoraciones) comprobando que la diferencia entre la concentración determinada a partir de la pesada y a partir de la valoración era menor de 0.5% en todos los casos. Se mantenía bajo atmósfera de nitrógeno y se utilizaba inmediatamente.

Acido clorhídrico. La disolución se preparó por dilución al volumen adecuado partir de la disolución acuosa al 37% determinando su concentración mediante valoración con KOH recientemente preparada y contrastada (tres titulaciones).



## 2. 2. INSTRUMENTOS.

Las medidas potenciométricas se realizaron con un microelectrodo combinado Ingold U402-M3-S7 conectado a un pH-metro Crison 501, que permitía apreciar 0.01 unidades de pH. Inmediatamente antes de una serie de medidas se ajustaba el electrodo con tampones estándar Crison comprobándose cada cierto número de medidas que dicho ajuste se mantenía. El sistema pH-metro-electrodo usado poseía alta reproducibilidad y pequeños tiempos de respuesta, aún cuando el entorno del electrodo se cambiase bruscamente de agua pura a una mezcla de alto contenido en dioxano.

La temperatura de las disoluciones se ha medido con un sensor de resistencia de platino conectado a un termómetro digital Crison 621 que permitía apreciar 0.1 °C. Todas las medidas se realizaron a  $25 \pm 0.1$  °C manteniendo la temperatura constante con un termostato Julabo PC.

Para el seguimiento de las cinéticas se utilizó un espectrofotómetro Cary 210, provisto de una torreta portamuestras termostatizable con capacidad para cinco muestras. Las condiciones en que se registraron las cinéticas fueron las siguientes: periodo = 1 segundo (es el tiempo necesario para que el indicador alcance el 98.6% del valor final de una señal de entrada en forma de escalón), anchura de banda espectral = 1 nm; se utilizó el aparato en modo "doble haz" colocando en la célula de referencia una

disolución de la misma composición que la de la célula de medida, excepto el PLP. El espectrofotómetro estaba interfaciado con un ordenador Inves PC-640x mediante un conversor analógico/digital de Data Translation DT-2801. El programa de adquisición de datos fue realizado amablemente por el profesor Obdulio López Mayorga de este Departamento.

Para la obtención de los espectros UV-Visible se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-70 provisto de una torreta portamuestras termostatizable con capacidad para seis muestras. Las condiciones en que se realizaron los espectros fueron las siguientes: periodo = 0.05 segundos y anchura de banda espectral = 1 nm. Este aparato trabaja en modo "haz simple" y en todos los casos se registraba previamente el espectro de una disolución de idéntica composición a la de medida, excepto el PLP. Al realizar los espectros el instrumento efectúa directamente la diferencia con el espectro de la disolución de referencia. Los espectros se registraron desde una longitud de onda superior a la cual la absorbancia era cero (desde 500 hasta 220 nm).

El almacenamiento y tratamiento posterior de datos se realizó con ordenadores PC (8086, 4 MHz) y AT (80286, 12 MHz).

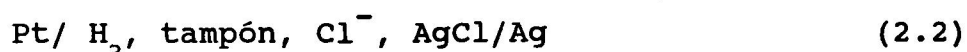
### 2. 3. MEDIDA DEL pH EN MEZCLAS AGUA-DIOXANO.

La escala de pH es la escala de acidez más comúnmente usada. El pH se define como  $-\log a_H$  siendo  $a_H$  la actividad del ión hidrógeno en el medio. La definición operacional de pH recomendada por la I.U.P.A.C. puede formularse como:

$$\text{pH}(x) = \text{pH}(s) + \frac{(E_x - E_s) \cdot F}{R \cdot T \cdot \ln 10} \quad (2.1)$$

siendo  $\text{pH}(s)$  el pH asignado a un patrón y  $\text{pH}(x)$  el de la disolución problema.  $E_s$  y  $E_x$  son los valores de la f.e.m. de una célula de medida de pH sumergida en el patrón y en la disolución problema, respectivamente.  $R$  es la constante de los gases,  $F$  es la constante de Faraday y  $T$  la temperatura en la escala Kelvin.

Para utilizar esta ecuación hay que asignar a disoluciones patrón valores inequívocos de pH, es decir, de  $a_H$ . Como no es posible medir la actividad de un ión individual, es necesario hacer alguna suposición sobre un coeficiente de actividad. En el caso de los tampones patrón N.B.S. se determina  $-\log (a_H \cdot \gamma_{Cl^-})$  (donde  $\gamma_{Cl^-}$  es el coeficiente de actividad del ión  $Cl^-$ ) a partir de la f.e.m. de la célula:



obteniéndose  $-\log a_H$  suponiendo que  $\gamma_{Cl^-}$  cumple la convención de

Bates-Guggenheim:

$$\log \gamma_{\text{Cl}^-} = - \frac{A \cdot I^{1/2}}{1 + 1.5 \cdot I^{1/2}} \quad (2.3)$$

donde  $I$  es la fuerza iónica y  $A$  la constante de Debye-Huckel. (Bates (1973) ofrece una amplia descripción de la asignación de valores de pH a patrones). La escala de actividades así definida es convencional ya que se basa en una suposición (ecuación 2.3).

Las células que se usan normalmente para medir el pH constan de un electrodo de vidrio y de un electrodo de referencia adecuado (calomelanos, por ejemplo). Este electrodo no tiene una respuesta ideal ya que, aunque la f.e.m. varíe linealmente con el pH, la pendiente se desvía del valor teórico  $F/(RT \ln 10)$ , y, por lo tanto, es necesario utilizar dos patrones para el ajuste del pH-metro. También hay que tener en cuenta que el potencial de unión líquida varía de las disoluciones patrón a la disolución problema. Dado que en disoluciones acuosas diluidas de solutos simples la influencia del potencial de unión líquida es mínima se considera que el pH medido coincide con el valor de  $-\log a_{\text{H}}$ . Esta aproximación no es válida en disoluciones acuosas de fuerza iónica relativamente alta ( $I > 0.2$ ), suspensiones, coloides y medios total o parcialmente acuosos (Bates, 1973). Nosotros nos encontramos en este último caso ya que nuestros experimentos se han realizado en mezclas agua-dioxano por lo cual la lectura del pH-metro (a la que llamaremos B), calibrado el aparato con tampones acuosos no se puede suponer, ni siquiera de forma aproximada, igual a  $-\log a_{\text{H}}$  (entendiendo por  $a_{\text{H}}$  una actividad protónica convencional tomando como estado de referencia la dilución infinita en el medio parcialmente no acuoso considerado).

Esto se debe básicamente a dos razones (Van Uitert y Haas, 1953): a) El potencial químico del ión hidrógeno a dilución infinita es diferente en agua y en una mezcla parcialmente no acuosa (efecto primario del medio); b) El potencial de unión

líquida varía también con la composición del medio.

Para resolver este problema hemos utilizado el método propuesto por Van Uitert et al (Van Uitert y Haas, 1953; Van Uitert y Fernelius, 1954) que calculan la actividad de protones a partir de B introduciendo un factor de corrección. A continuación describiremos dicho método.

Se define  $U_H$  como:

$$U_H = \frac{10^{-B}}{[H^+]} \quad (2.4)$$

donde  $[H^+]$  es la concentración molar de protones.  $U_H$  es, en general, función de la composición del disolvente, de la temperatura, y de la concentración iónica y se puede calcular a partir de la lectura del pH-metro, B, en disoluciones de concentración conocida de HCl. El efecto de la fuerza iónica puede eliminarse corrigiendo  $U_H$  con el coeficiente de actividad del protón,  $\gamma_H$ :

$$U_H^0 = \frac{U_H}{\gamma_H} \quad (2.5)$$

Por lo tanto, la magnitud  $U_H^0$  es función únicamente de la composición del disolvente y de la temperatura. Como no se puede disponer de valores de  $\gamma_H$ , Van Uitert y Haas los supusieron iguales a los coeficientes de actividad iónicos medios de HCl,  $\gamma_{\pm}$ , en las mezclas agua-dioxano, lo cual está de acuerdo con la teoría de Debye-Huckel en su forma más simple. Sustituyendo la ecuación 2.4 en 2.5 y tomando logaritmos tenemos que:

$$B + \log U_H^0 = - \log ([H^+] \cdot \gamma_{\pm}) = - \log a_H \quad (2.6)$$

ya que hemos supuesto  $\gamma_H = \gamma_{\pm}$ . Teniendo en cuenta la definición de pH:

$$\text{pH} = B + \log U_H^0 \quad (2.7)$$

Por tanto  $\log U_H^0$  es el factor de corrección que hay que sumar a la lectura del pH-metro, B, para obtener el pH.

En todos los experimentos llevados a cabo en la presente memoria la temperatura ha sido 25 °C, hemos utilizado los valores de  $\log U_H^0$  determinados a esta temperatura por Sánchez-Ruiz et al (1984a) (figura 2.1).

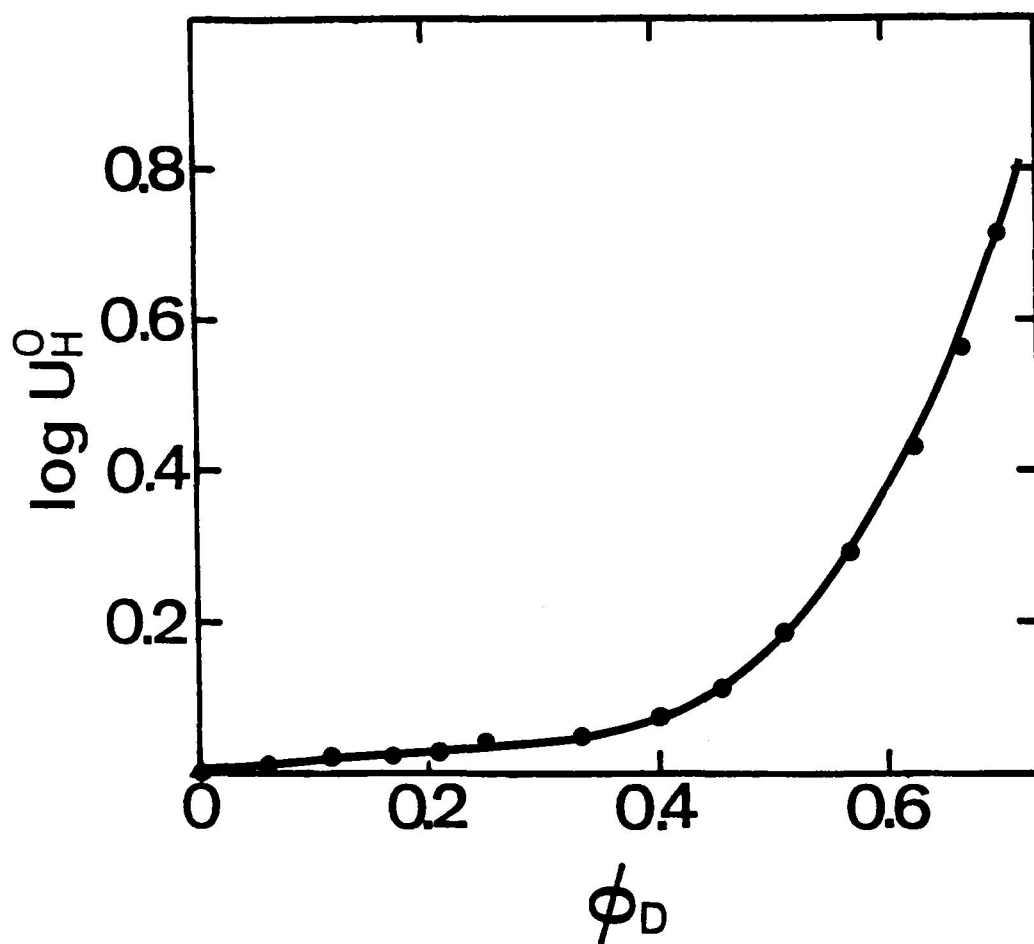


FIGURA 2.1. Factores de corrección para la medida del pH en mezclas agua-dioxano a 25 °C (Sánchez-Ruiz et al, 1984a).  $\phi_D$  indica la fracción en peso de dioxano de la mezcla.



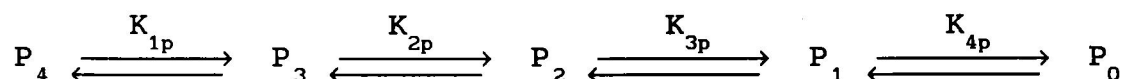


3. DETERMINACION DE CONSTANTES DE  
EQUILIBRIO DE IONIZACION DEL  
5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL



### 3. 1. FUNDAMENTO TEORICO.

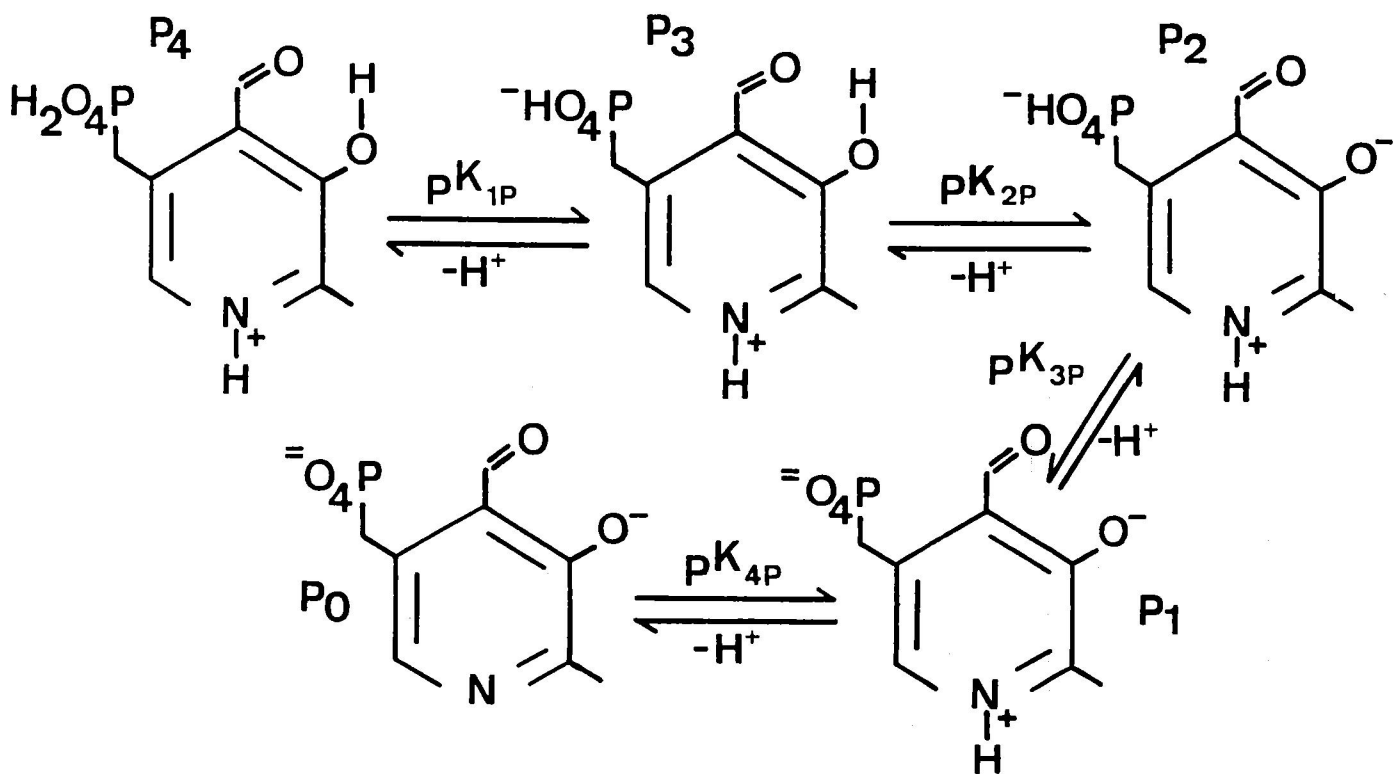
El 5'-fosfato de piridoxal (PLP) es un ácido tetraprótico cuya ionización puede describirse según el siguiente esquema:



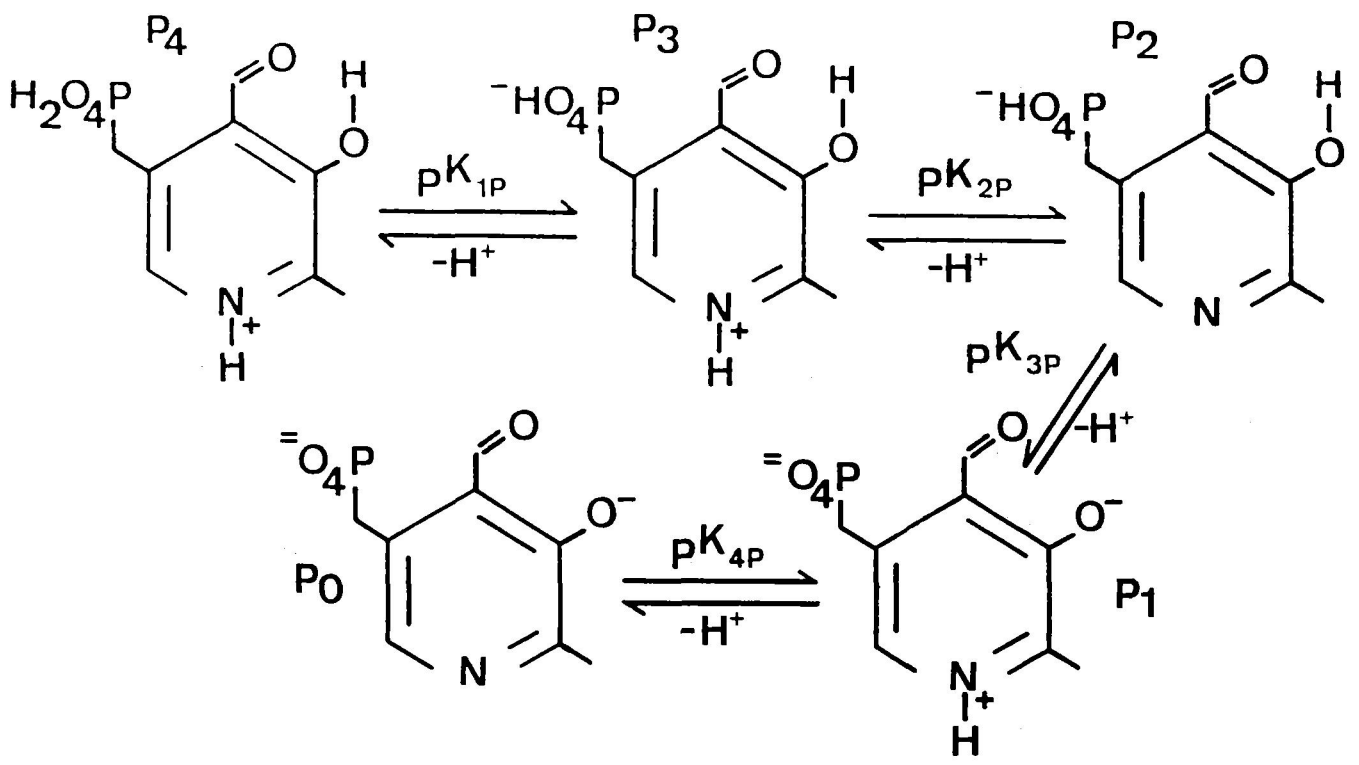
donde  $K_{1p} \dots K_{4p}$  son las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas y  $P_i$  la especie iónica del PLP con  $i$  protones lábiles. La relación entre la carga de cada especie,  $q$ , con el número de protones que posee es:

$$q = i - 3, \quad i = 1, \dots, 4 \quad (1)$$

Cada especie iónica consta de varias formas tautoméricas en equilibrio las cuales tienen el mismo número de protones y por lo tanto la misma carga neta (Cortijo et al, 1988). En los esquemas 1 y 2 aparecen representadas las formas tautoméricas mayoritarias de cada especie en agua pura y en la mezcla con un 0.6 de fracción en volumen de dioxano, respectivamente. La proporción relativa de las diferentes formas tautoméricas de una especie dada cambia con el disolvente, estabilizándose en agua las formas dipolares que son mayoritarias en las especies  $P_2$  y  $P_1$ . Al disminuir la polaridad del medio, como ocurre en nuestro caso al aumentar la proporción



ESQUEMA 1. Formas tautoméricas mayoritarias del PLP en agua pura.



ESQUEMA 2. Formas tautoméricas mayoritarias del PLP en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

de dioxano, aumenta la contribución de los tautómeros neutros (en el esquema 2 vemos que en la mezcla del 0.6 de dioxano la forma mayoritaria de la especie  $P_2$  es la forma neutra con el oxígeno fenólico protonado).

Asimismo el grupo aldehído del PLP puede estar hidratado por lo que cada especie iónica consta de formas aldehído e hidrato en equilibrio (en los esquemas 1 y 2 hemos representado solo las formas aldehído). La proporción de las formas hidrato aumenta con la carga neta positiva del anillo teniendo una contribución importante a pH ácido (Korytnyk y Singh, 1963). Lógicamente, al disminuir la cantidad de agua del disolvente la proporción de las formas hidrato se va haciendo menor. Una completa información acerca de la proporción de cada una de las formas de PLP en una determinada especie iónica puede encontrarse en las referencias: Sánchez-Ruiz et al (1984b y 1984c), Cortijo et al (1988) y Llor et al (1988).

Hemos determinado las constantes de ionización macroscópicas del PLP en mezclas agua-dioxano mediante valoración potenciométrica con una base fuerte, KOH. Estas constantes están definidas de la siguiente forma:

$$K_{1p} = \frac{a_{p3}}{a_{p4}} \cdot a_H = \frac{[P_3]}{[P_4]} \cdot \frac{\gamma_{p3}}{\gamma_{p4}} \cdot a_H \quad (2)$$

$$K_{2p} = \frac{a_{p2}}{a_{p3}} \cdot a_H = \frac{[P_2]}{[P_3]} \cdot \frac{\gamma_{p2}}{\gamma_{p3}} \cdot a_H \quad (3)$$

$$K_{3p} = \frac{a_{p1}}{a_{p2}} \cdot a_H = \frac{[P_1]}{[P_2]} \cdot \frac{\gamma_{p1}}{\gamma_{p2}} \cdot a_H \quad (4)$$

$$K_{4p} = \frac{a_{p0}}{a_{p1}} \cdot a_H = \frac{[P_0]}{[P_1]} \cdot \frac{\gamma_{p0}}{\gamma_{p1}} \cdot a_H \quad (5)$$

donde  $a_{p_i}$  es la actividad de la especie  $P_i$ ,  $\gamma_{p_i}$  es su coeficiente de actividad en la escala molar,  $[P_i]$  es su concentración y  $a_H = 10^{-pH}$ .

A continuación deduciremos la ecuación del volumen teórico de KOH añadido en cada momento de la valoración en función del pH y de las constantes de ionización (ecuación 20). En todos los casos la disolución inicial de PLP se preparó a partir del producto sólido en estado neutro,  $C_8H_{10}NO_6P.H_2O$ . En cada instante de la valoración el balance de carga es el siguiente:

$$[H^+] + [P_4] + [K^+] = [OH^-] + 3.[P_0] + 2.[P_1] + [P_2] \quad (6)$$

y despejando  $[K^+]$ :

$$[K^+] = [OH^-] - [H^+] + [P]_t \cdot Q_p \quad (7)$$

donde  $[P]_t$  es la concentración total de PLP:

$$[P]_t = [P_0] + [P_1] + [P_2] + [P_3] + [P_4] \quad (8)$$

siendo  $[P]_t \cdot Q_p$  la carga total aportada por el PLP.  $Q_p$  representa la carga media total que aporta el PLP por molécula y viene dada por:

$$Q_p = 3 \cdot p_0 + 2 \cdot p_1 + p_2 - p_4 \quad (9)$$

donde  $p_i$  es la fracción de la especie iónica  $P_i$  referida a la concentración total de PLP:

$$p_i = \frac{[P_i]}{[P]_t} \quad (10)$$

Necesitamos alguna forma de estimar los coeficientes de actividad de las especies iónicas del PLP; aquí hemos supuesto que

$$\gamma_{pi} = (\gamma_{\pm})^q \quad (11)$$

donde  $\gamma_{\pm}$  es el coeficiente de actividad iónico medio de un electrolito 1:1 (en nuestro caso el ácido clorhídrico). La ecuación 11 está de acuerdo con la teoría electrostática simple de interacciones ión-ión y nos permite calcular los  $\gamma_{pi}$  conociendo el  $\gamma_{\pm}$  del ácido clorhídrico para la misma fuerza iónica y composición de la disolución en cuestión (Harned y Owen, 1958). Conviene destacar que según esta ecuación el coeficiente de actividad de la especie  $P_3$  vale 1 ya que se trata de una especie no cargada. Este método de cálculo de coeficientes de actividad ya ha sido utilizado en otros estudios de compuestos del grupo de la vitamina  $B_6$  en mezclas agua-dioxano: Sánchez-Ruiz et al. (1984a y 1984c) y Cortijo et al. (1988). Hay que tener en cuenta que cualquier suposición que se haga para calcular los coeficientes de actividad en medios de baja polaridad es arriesgada debido a las fuertes interacciones ión-ión y a la gran probabilidad de asociaciones



iónicas para iones con carga mayor de 1 en valor absoluto, aumentando además esta probabilidad en las mezclas con alto contenido en dioxano. Es conveniente, pues, considerar los valores de  $\gamma_{pi}$  calculados para la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano como estimaciones.

Teniendo en cuenta las ecuaciones 2-5, 8, 10 y 11 las fracciones de las formas iónicas del PLP vendrán dadas por las siguientes expresiones:

$$p_i = \frac{Z_{pi}}{Z_p} \quad (12)$$

donde

$$Z_{p0} = 1 \quad (13)$$

$$Z_{p1} = \frac{a_H}{K_{4p}} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (14)$$

$$Z_{p2} = \frac{a_H^2}{K_{3p} K_{4p}} \cdot (\gamma_{\pm})^8 \quad (15)$$

$$Z_{p3} = \frac{a_H^3}{K_{2p} K_{3p} K_{4p}} \cdot (\gamma_{\pm})^9 \quad (16)$$

$$Z_{p4} = \frac{a_H^4}{K_{1p} K_{2p} K_{3p} K_{4p}} \cdot (\gamma_{\pm})^8 \quad (17)$$

$$Z_p = \sum_{i=0}^4 Z_{pi} = 1 + Z_{p1} + Z_{p2} + Z_{p3} + Z_{p4} \quad (18)$$

Sustituyendo en (9) tenemos que  $Q_p$  es:

$$Q_p = 3 - \frac{Z_{p1} + 2.Z_{p2} + 3.Z_{p3} + 4.Z_{p4}}{Z_p} \quad (19)$$

Sustituyendo en la ecuación 7 las concentraciones de  $K^+$  y de PLP total en función del volumen inicial de la disolución de PLP,  $v_0$ , y del volumen de KOH añadido en cada momento,  $v$ , ( $[K^+] = b.v/(v_0+v)$  y  $[P]_t = a.v_0/(v_0+v)$ ) y despejando  $v$  tendremos:

$$v = v_0 \cdot \frac{[OH^-] - [H^+] + a \cdot Q_p}{b - [OH^-] + [H^+]} \quad (20)$$

siendo  $a$  la concentración inicial de la disolución de PLP y  $b$  la concentración de la disolución de KOH. Esta ecuación nos da el volumen teórico de KOH en cada instante de la valoración en función del pH y de las constantes de ionización macroscópicas y, por lo tanto, nos permite obtener estas constantes mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos experimentales.

### 3. 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Las valoraciones se han llevado a cabo en un recipiente termostatzado a 25 °C, cerrado y bajo atmósfera de nitrógeno partiendo en todos los casos de un volumen inicial de disolución de PLP de 2 mls.

La disolución de KOH se añadía a través de un tubo de teflón introducido en la disolución de PLP y unido a una jeringa Hamilton de 2.5 mls accionada por un tornillo micrométrico "Mitutoyo" de 0.01 mm de precisión. Este tornillo se calibró a 25 °C mediante pesada con agua desionizada y desgasificada. El volumen total de KOH añadido oscilaba entre 0.25 mls (disolución de PLP más diluida en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano) y 1.8 mls (disolución más concentrada en agua pura) siendo el volumen de cada adición de algunos microlitros, comprobándose en todos los casos que el sistema empleado era totalmente reproducible.

Trás cada adición de KOH se agitaba convenientemente la disolución y se tomaba el valor de la lectura del pH-metro, B, (sin agitación) cuando era estable.

Las disoluciones de PLP y KOH se preparaban con la misma proporción de dioxano con lo cual ésta se mantenía constante durante el transcurso de la valoración.

Para cada mezcla agua-dioxano se efectuaron cinco valoraciones con distinta concentración inicial de PLP excepto

para la mezcla con un 0.6 de fracción en volumen de dioxano para la cual solo se realizaron cuatro valoraciones. Las concentraciones iniciales de PLP estaban comprendidas entre  $2 \cdot 10^{-3}$  M y  $3 \cdot 10^{-2}$  M para agua pura y la mezcla del 0.2, entre  $2 \cdot 10^{-3}$  M y  $2 \cdot 10^{-2}$  M para la mezcla del 0.4 y entre  $1 \cdot 10^{-3}$  M y  $1 \cdot 10^{-2}$  M para la mezcla del 0.6 (figuras 1-4).

### 3. 3. ANALISIS DE DATOS.

La ecuación 20 nos permite obtener los valores de  $pK_{ip}$  mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos experimentales de pH y volumen. Para ello hemos utilizado un programa de ajuste de este tipo amablemente cedido por el Dr. Ernesto Freire de la Johns Hopkins University (EE.UU). Este programa es general y permite al usuario crear distintos programas de ajuste no lineal por mínimos cuadrados para situaciones diferentes por lo cual se puede considerar como un programa generador de programas (P.G.P.). En nuestro caso el algoritmo principal de ajuste minimiza la suma del cuadrado de las desviaciones entre el volumen experimental y el volumen teórico calculado.

Para definir la función a ajustar es necesario escribir una subrutina a la que se remite el algoritmo principal del programa en cada pareja de datos (pH,v). Esta subrutina permite el cálculo de la variable dependiente (en nuestro caso el volumen), en términos de la variable independiente (pH), de los parámetros ajustables ( $pK_{ip}$ ) y de unas variables independientes adicionales (en este caso la concentración inicial de PLP). Es decir, la subrutina permite calcular el volumen teórico para cada pH y para los valores de los  $pK_{ip}$  supuestos en ese momento del ajuste. La posibilidad de incluir estas variables adicionales es muy

importante ya que así el programa permite ajustar varias series de datos simultáneamente, incluyendo datos obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales.

La ecuación del volumen teórico (20) viene dada en función de los coeficientes de actividad que se pueden calcular fácilmente por interpolación entre los datos de Harned y Owen (Apéndice I) si sabemos la fuerza iónica de la disolución, la cual viene dada por:

$$I = \frac{1}{2} \cdot \left( [H^+] + [P_4] + [K^+] + [OH^-] + 9 [P_0] + 4 [P_1] + [P_2] \right) \quad (21)$$

y teniendo en cuenta la electroneutralidad (ecuación 6):

$$I = [OH^-] + [P]_t \cdot I_p \quad (22)$$

donde  $[P]_t \cdot I_p$  es la fuerza iónica total aportada por el PLP e  $I_p$  es igual a:

$$I_p = 6 \cdot p_0 + 3 \cdot p_1 + p_2 \quad (23)$$

Sustituyendo las expresiones de las especies iónicas tenemos que

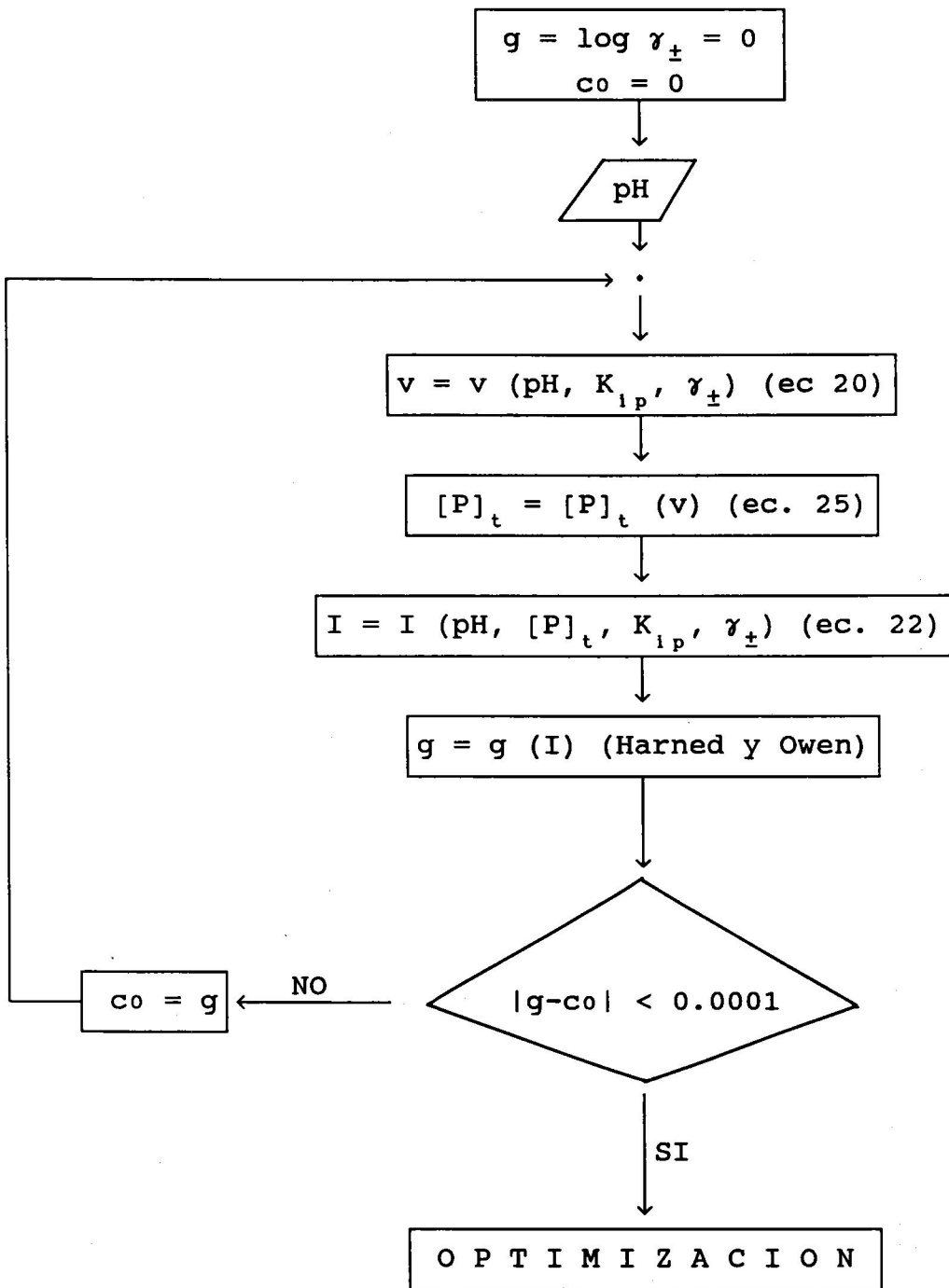
$$I_p = \frac{6 + 3 \cdot Z_{p1} + Z_{p2}}{Z} \quad (24)$$

Observando la ecuación 22 vemos que para calcular la fuerza iónica necesitamos conocer  $[P]_t$  y por lo tanto el volumen de KOH añadido:

$$[P]_t = a \cdot \frac{v_0}{v_0 + v} \quad (25)$$

El valor de  $v$  que aparece en esta ecuación es precisamente el volumen teórico calculado al final de la subrutina, por lo tanto es necesario plantear un procedimiento iterativo que calcule  $\gamma_{\pm}$  y  $v$  para cada pareja de datos y para todos los valores que los parámetros vayan adquiriendo en el transcurso del ajuste. El primer ciclo del procedimiento iterativo comienza suponiendo  $\gamma_{\pm}=1$  y, para ese valor y con los valores que los parámetros tengan en ese momento del ajuste, calcula el volumen a partir de la ecuación 20. Con este  $v$  se obtienen  $[P]_t$  (ecuación 25) y la fuerza iónica (ecuación 22). Con este valor de  $I$  se pasa a calcular  $\gamma_{\pm}$  a partir de los datos de Harned y Owen (Apéndice I). Este valor de  $\gamma_{\pm}$  es el utilizado de partida en el segundo ciclo. Este procedimiento se repite hasta que en dos ciclos sucesivos la diferencia entre los  $\gamma_{\pm}$  calculados es menor de 0.0001 (en el esquema 3 se muestra el diagrama de flujo de la subrutina y en el apéndice II. 1. su código fuente). Cuando se completa el procedimiento iterativo para cada pH con el valor que los parámetros tengan en ese momento del ajuste se pasa al proceso de optimización.

Hemos realizado ajustes simultáneos con todas las valoraciones de cada mezcla agua-dioxano introduciendo como variable independiente adicional la concentración inicial de PLP. Así hemos obtenido los valores de las constantes de equilibrio de ionización que producen un mejor ajuste de la expresión del volumen teórico (ecuación 20) a nuestros datos experimentales obtenidos en diferentes condiciones de fuerza iónica.



ESQUEMA 3



### 3. 4. RESULTADOS.

Usando el método descrito en la sección anterior hemos determinado las constantes de ionización termodinámicas del 5'-fosfato de piridoxal en agua y en las mezclas con 0.2, 0.4 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

La primera ionización del PLP tiene lugar a pH muy ácido presentando el  $pK_{1p}$  serias dificultades para su determinación por medidas potenciométricas. Este  $pK$  lo introducimos inicialmente como un parámetro en nuestro programa comprobando que en ninguna mezcla agua-dioxano el ajuste era sensible a él. Sólo cuando se fijaba en valores por encima de 2.5 los ajustes empeoraban sustancialmente y de forma muy acusada en la zona ácida de pH. Por lo tanto podemos concluir que no disponemos de suficiente información para determinar  $pK_{1p}$  y que en todos los casos es menor de 2.5 sin poder precisar más. A la vista de esto el procedimiento seguido ha sido no incluir  $pK_{1p}$  como parámetro de ajuste.

En la tabla 1 se muestran los valores de  $pK_{1p}$  obtenidos y en las figuras 1-4 los resultados de los ajustes. Como puede observarse las curvas teóricas coinciden muy bien con los datos experimentales. Sólo se aprecian pequeñas diferencias en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano. Estas diferencias podrían explicarse si tenemos en cuenta que al disminuir la polaridad del medio la probabilidad de asociaciones iónicas

TABLA 1. Valores óptimos de  $pK_{ip}$  obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas de PLP a 25 °C en mezclas agua-dioxano.  $\Phi_D$  representa la fracción en volumen de dioxano.

$\Phi_D$	$pK_{2p}$	$pK_{3p}$	$pK_{4p}$
0	3.73	6.50	8.91
0.2	3.88	7.15	9.19
0.4	3.98	7.97	9.93
0.6	3.96	8.90	11.29

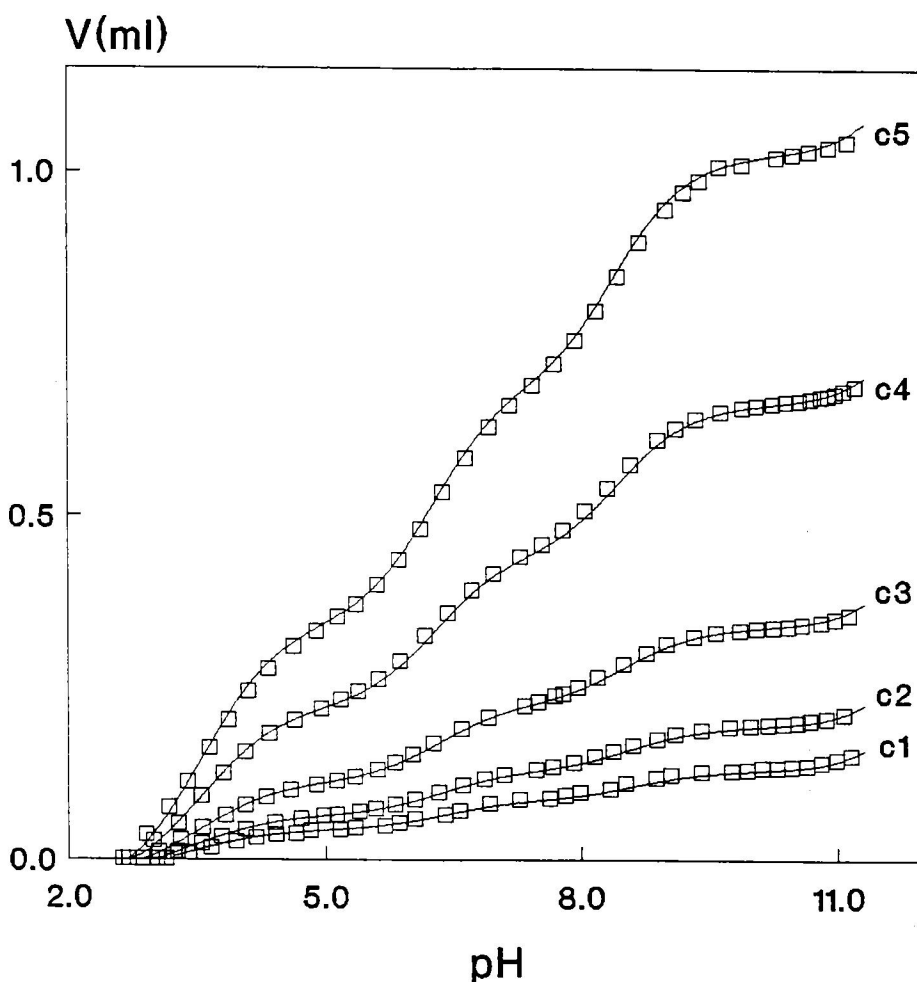
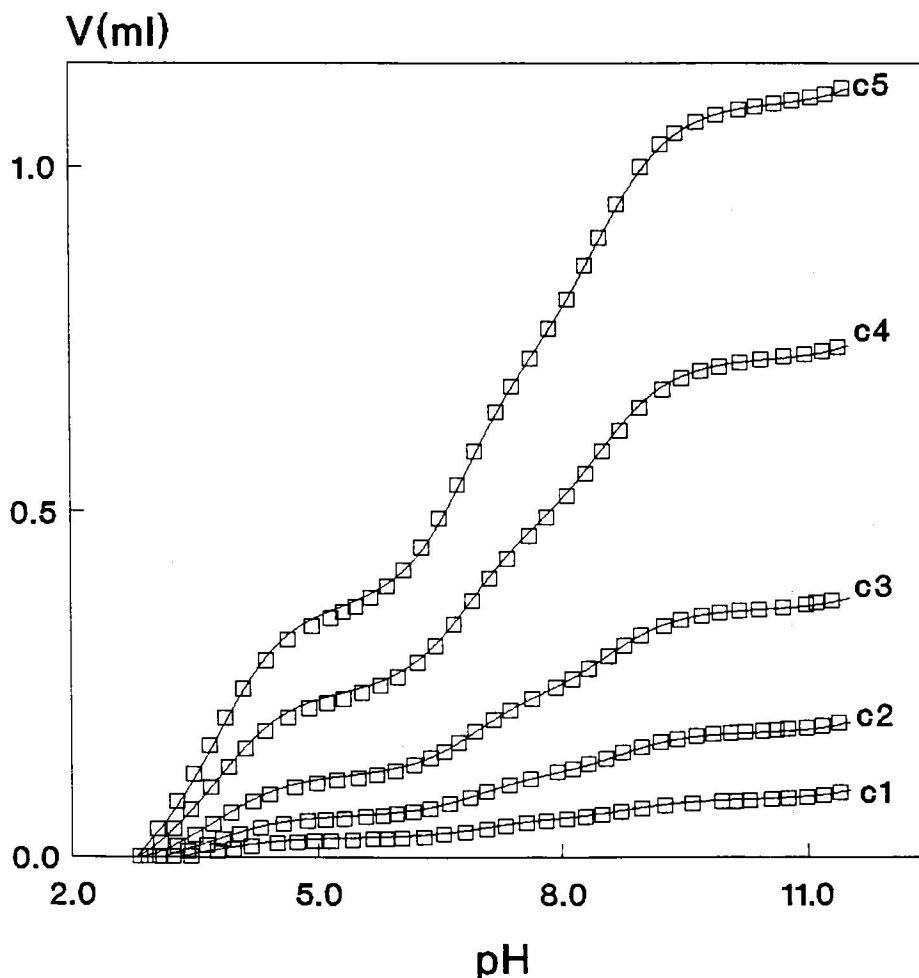


FIGURA 1. Volumen de KOH añadido a la disolución de PLP (2 mls) en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en agua pura a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 20 y los valores de  $pK_{ip}$  obtenidos en los ajustes (tabla 1). (□) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$$c_1 = 3.89 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 5.80 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 1.01 \times 10^{-2} \text{ M},$$

$$c_4 = 1.97 \times 10^{-2} \text{ M} \text{ y } c_5 = 3.06 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.79 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos.



**FIGURA 2.** Volumen de KOH añadido a la disolución de PLP (2 mls) en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 20 y los valores de  $pK_{ip}$  obtenidos en los ajustes (tabla 1). ( $\square$ ) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$$c_1 = 2.31 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 4.97 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 9.80 \times 10^{-3} \text{ M}, \\ c_4 = 1.97 \times 10^{-2} \text{ M} \text{ y } c_5 = 2.99 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante  $1.64 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

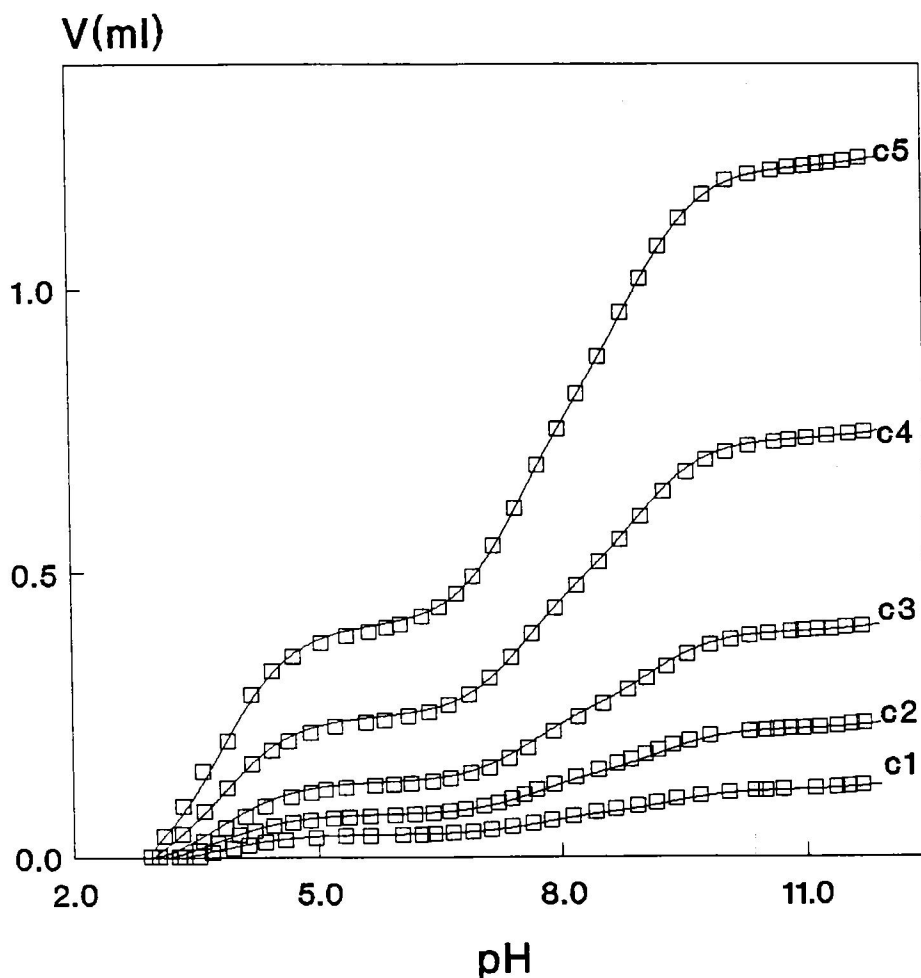


FIGURA 3. Volumen de KOH añadido a la disolución de PLP (2 mls) en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 20 y los valores de  $pK_{ip}$  obtenidos en los ajustes (tabla 1). (□) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$$c_1 = 2.04 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 3.88 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 6.80 \times 10^{-3} \text{ M},$$

$$c_4 = 1.27 \times 10^{-2} \text{ M y } c_5 = 2.10 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.03 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos.

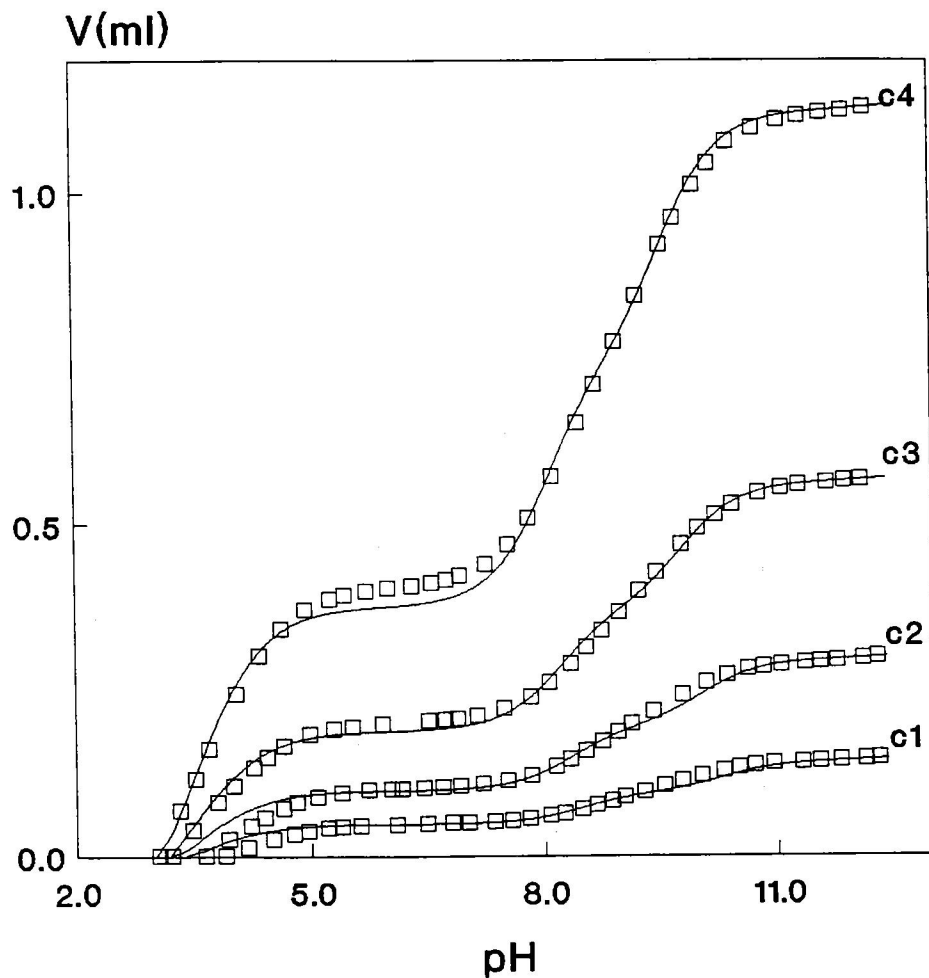


FIGURA 4. Volumen de KOH añadido a la disolución de PLP (2 mls) en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 20 y los valores de  $pK_{ip}$  obtenidos en los ajustes (tabla 1). ( $\square$ ) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$$c_1 = 1.29 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 2.66 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 5.08 \times 10^{-3} \text{ M y}$$

$c_4 = 1.01 \times 10^{-2} \text{ M}$ . La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.79 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos.

aumenta mucho. Considerando además las cargas de las especies iónicas del PLP presentes,  $P_4^+$ ,  $P_2^-$ ,  $P_1^{2-}$  y  $P_0^{3-}$ , podemos suponer que en la mezcla del 0.6 en dioxano podrían existir asociaciones iónicas muy fuertes, y por lo tanto los  $\gamma_{p_i}$  obtenidos deben de considerarse como estimaciones (Sección 3. 1.). Por todo esto, los valores de  $pK_{ip}$  obtenidos en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano también se deben interpretar como estimaciones. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Cortijo et al (1988) con un método experimental diferente (figura 13) observamos que, efectivamente, solo parece haber diferencias apreciables en el caso de los  $pK_{ip}$  de la mezcla de 0.6 de fracción en dioxano ya que el resto (agua pura, 0.2 y 0.4 en dioxano) son perfectamente comparables.

La variación de la fuerza iónica en el transcurso de la valoración se muestra en las figuras 5-8 donde vemos que las valoraciones se han realizado a fuerza iónica diferente y que ésta aumenta a lo largo de las mismas.

La variación de las fracciones de las especies iónicas del PLP,  $p_i$ , con el pH calculadas a partir de las constantes de ionización termodinámicas obtenidas se muestran en las figuras 9-12.

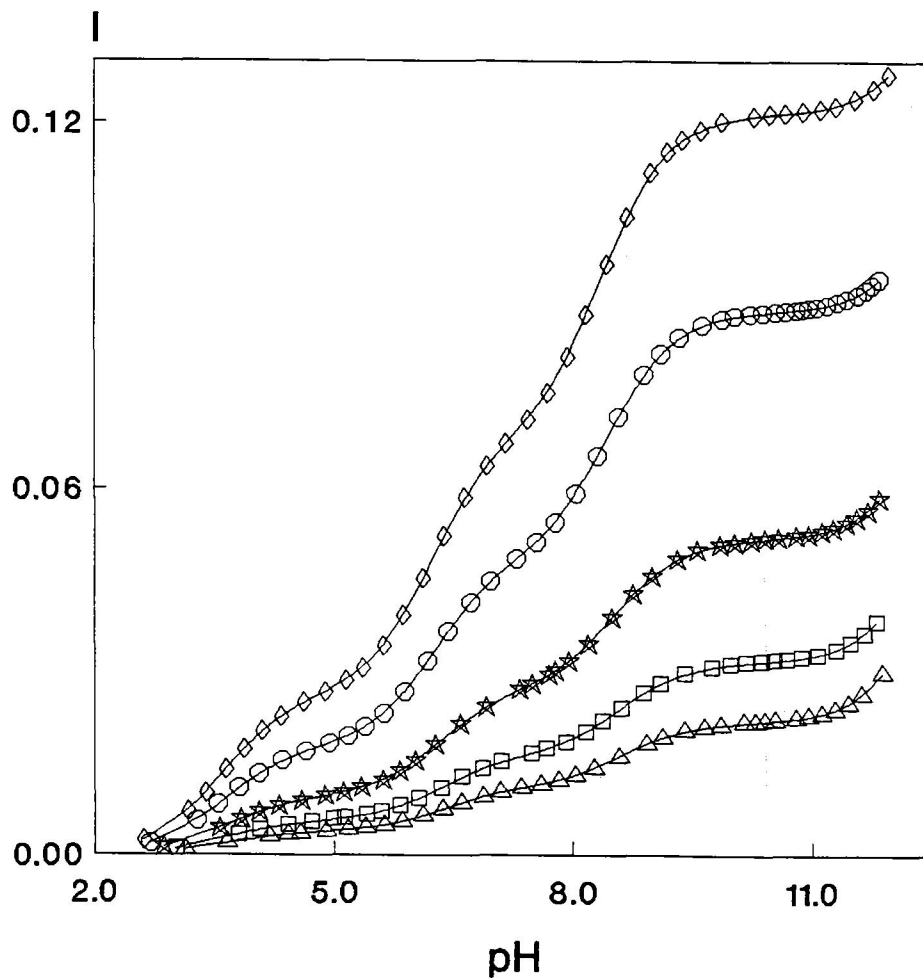


FIGURA 5. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP frente al pH en agua pura a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$\Delta = 3.89 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $\square = 5.80 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $\star = 1.01 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  
 $\circ = 1.97 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $\diamond = 3.06 \times 10^{-2} \text{ M}$ .

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.79 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 1.



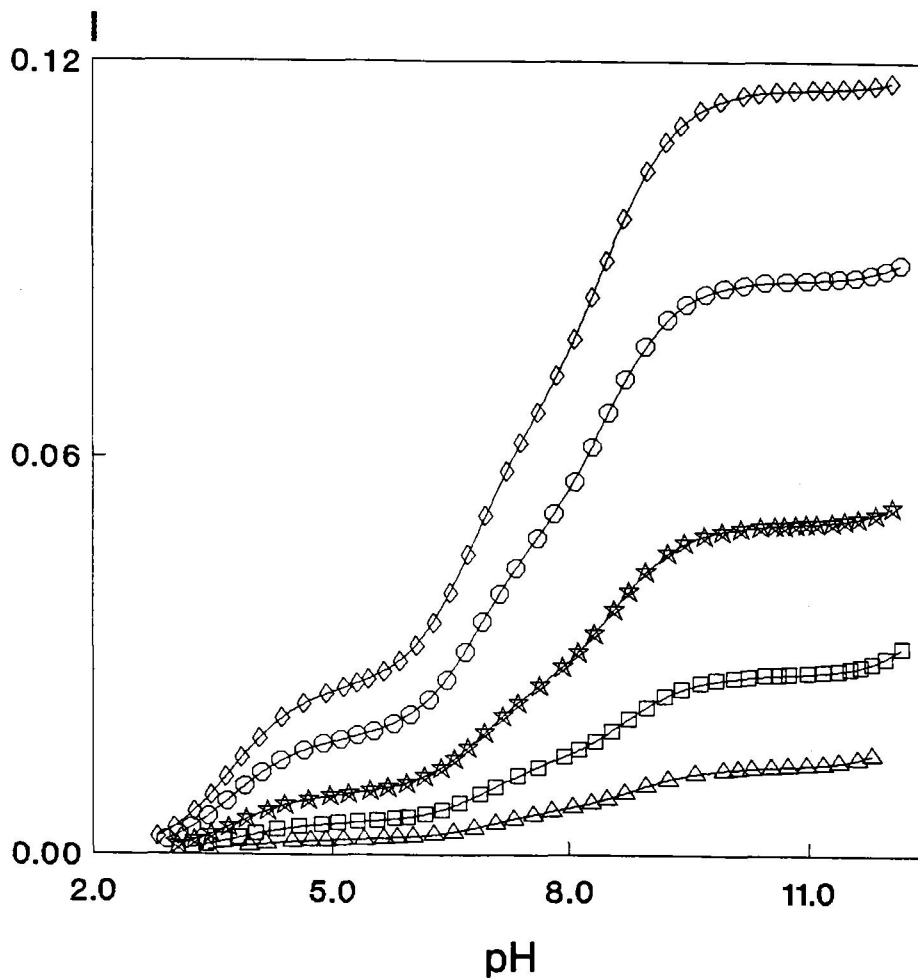


FIGURA 6. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$\Delta = 2.31 \times 10^{-3}$  M,  $\square = 4.97 \times 10^{-3}$  M,  $\star = 9.80 \times 10^{-3}$  M,  
 $\circ = 1.97 \times 10^{-2}$  M y  $\diamond = 2.99 \times 10^{-2}$  M.

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.64 \times 10^{-1}$  M en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 2.

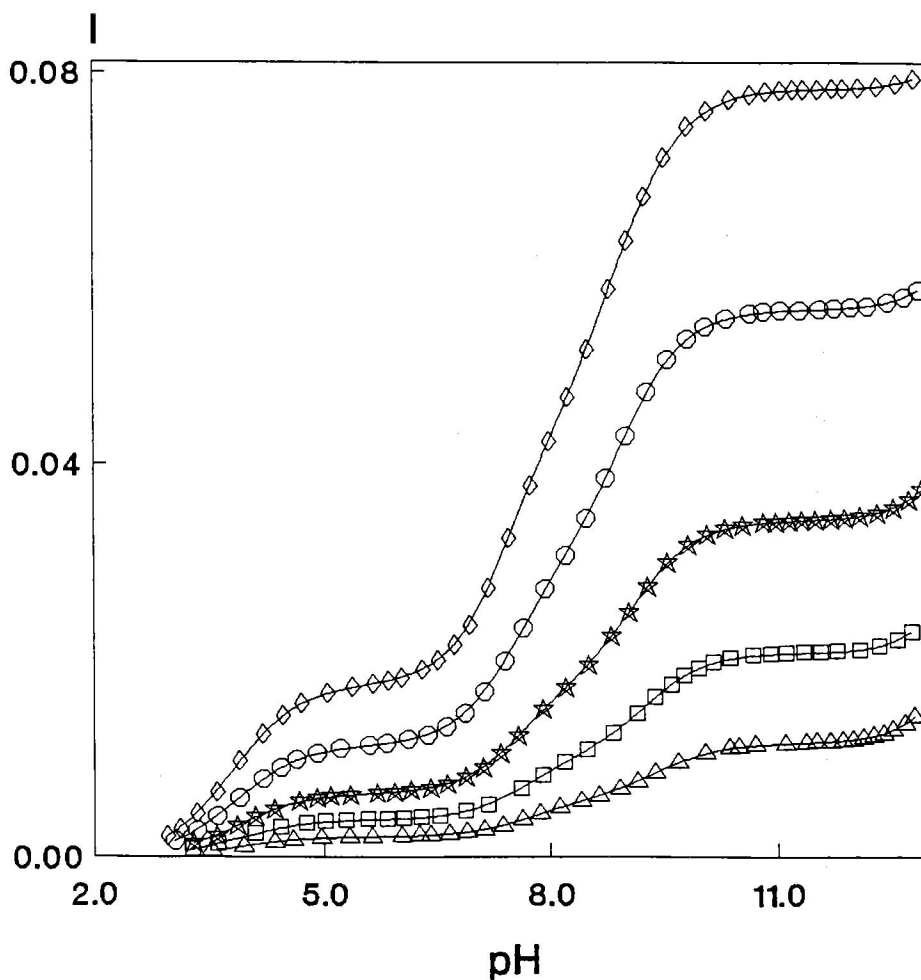


FIGURA 7. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP son:

$\Delta = 2.04 \times 10^{-3}$  M,  $\square = 3.88 \times 10^{-3}$  M,  $\star = 6.80 \times 10^{-3}$  M,  
 $\circ = 1.27 \times 10^{-2}$  M y  $\diamond = 2.10 \times 10^{-2}$  M.

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.03 \times 10^{-1}$  M en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 3.

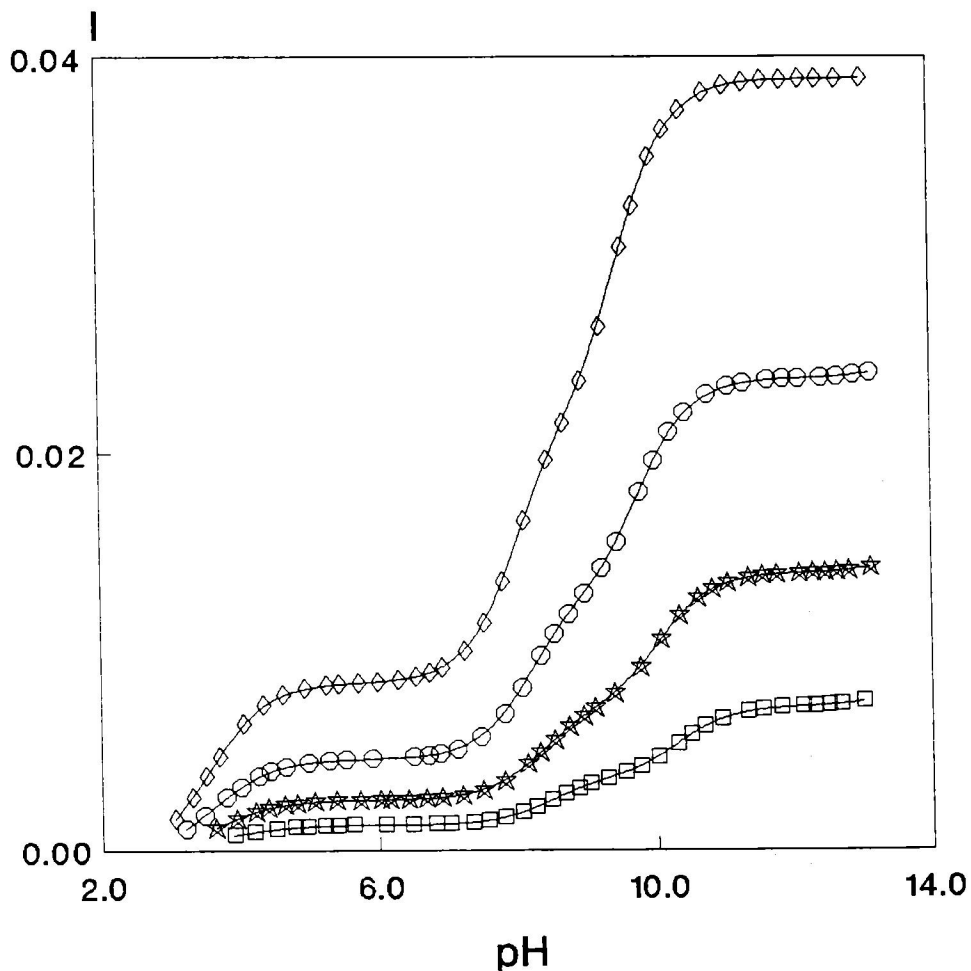


FIGURA 8. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP son:

- =  $1.29 \times 10^{-3}$  M, ☆ =  $2.66 \times 10^{-3}$  M, ○ =  $5.08 \times 10^{-3}$  M y
- ◇ =  $1.01 \times 10^{-2}$  M.

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.79 \times 10^{-1}$  M en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 4.

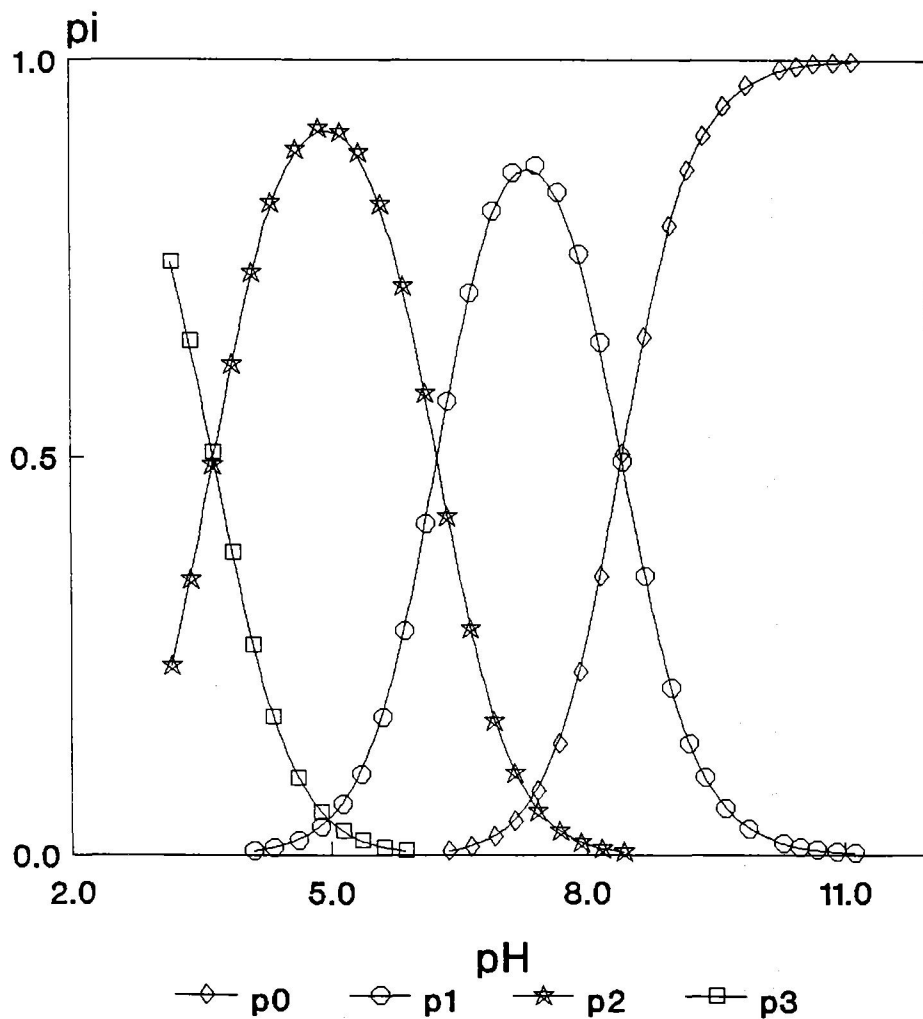


FIGURA 9. Fracciones de las especies iónicas del PLP frente al pH en agua pura a 25 °C. Estas fracciones se han calculado con los  $pK_{ip}$  termodinámicos (tabla 1) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 12, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

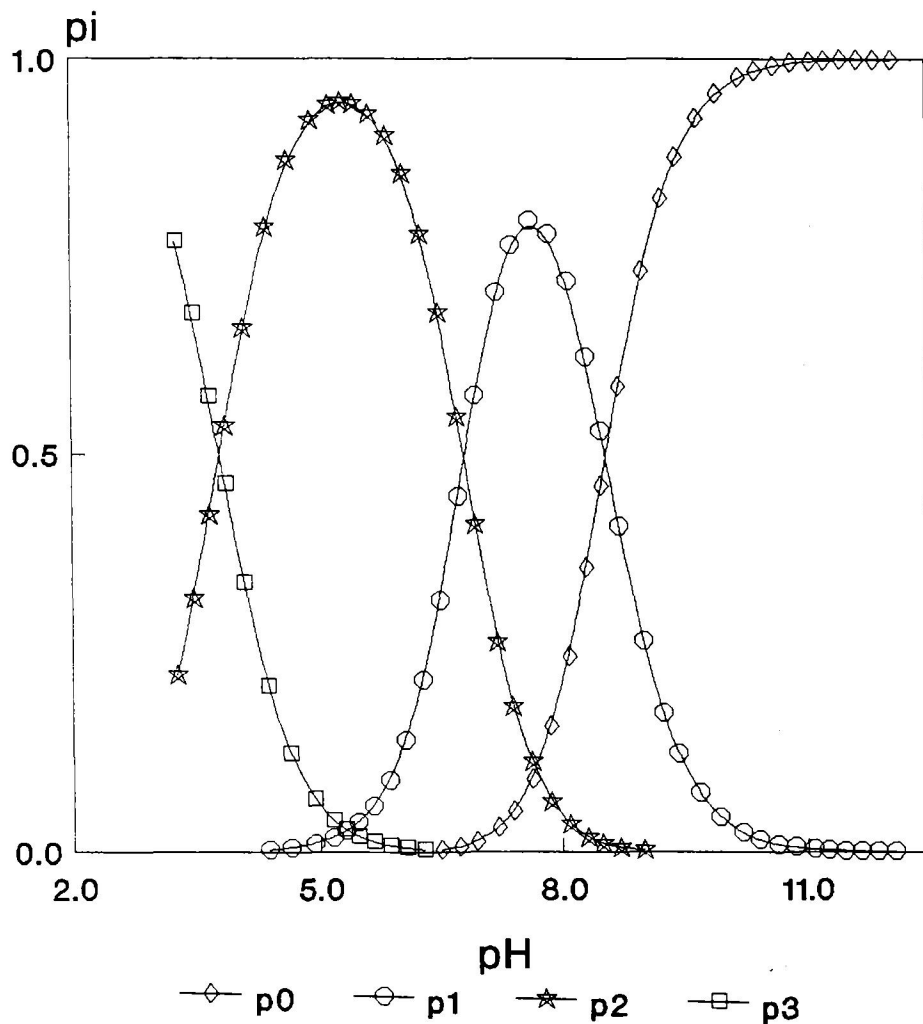


FIGURA 10. Fracciones de las especies iónicas del PLP frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado con los  $pK_{ip}$  termodinámicos (tabla 1) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 12, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

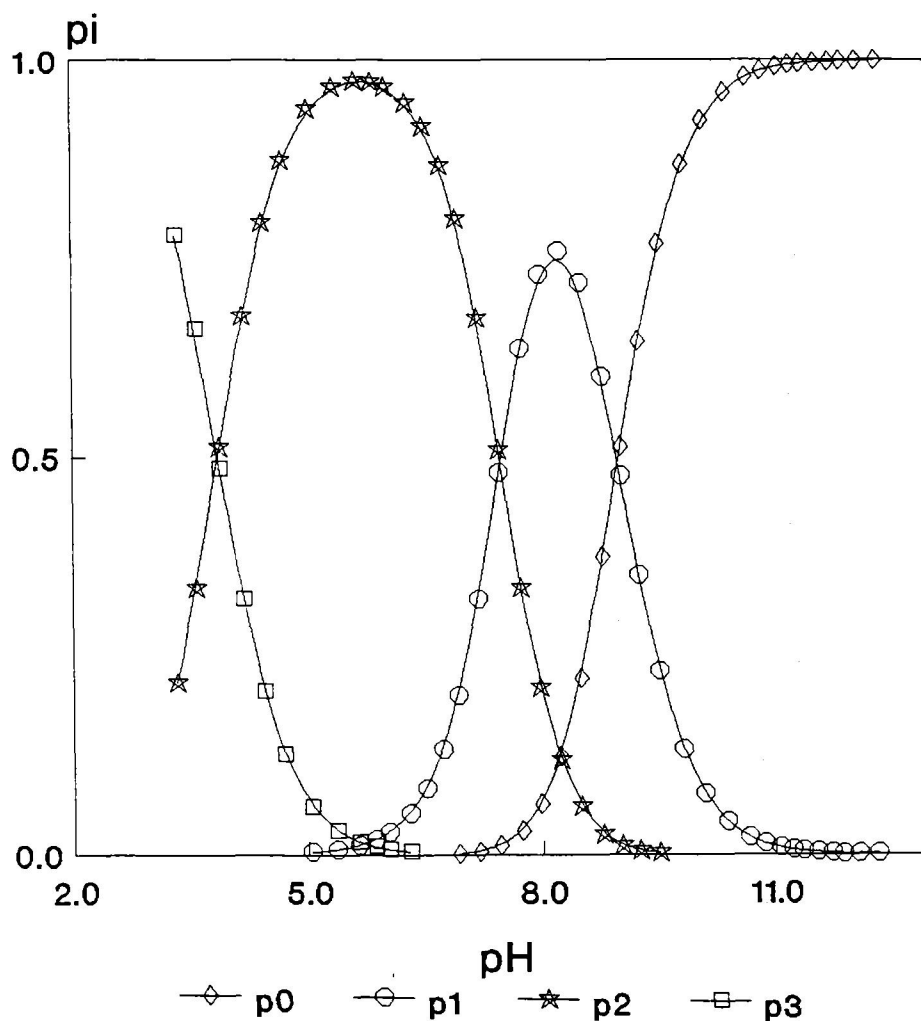


FIGURA 11. Fracciones de las especies iónicas del PLP frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado con los  $pK_{ip}$  termodinámicos (tabla 1) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 12, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

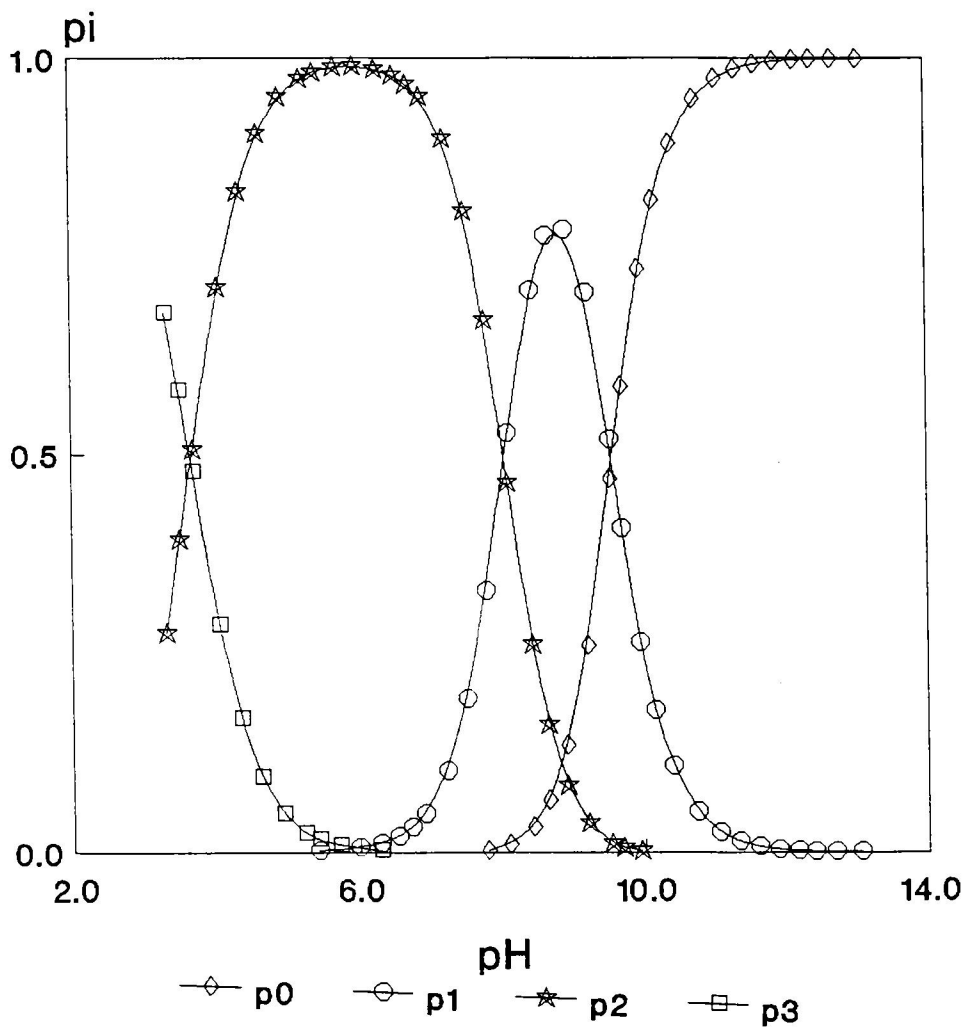


FIGURA 12. Fracciones de las especies iónicas del PLP frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado con los  $pK_{ip}$  termodinámicos (tabla 1) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 12, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

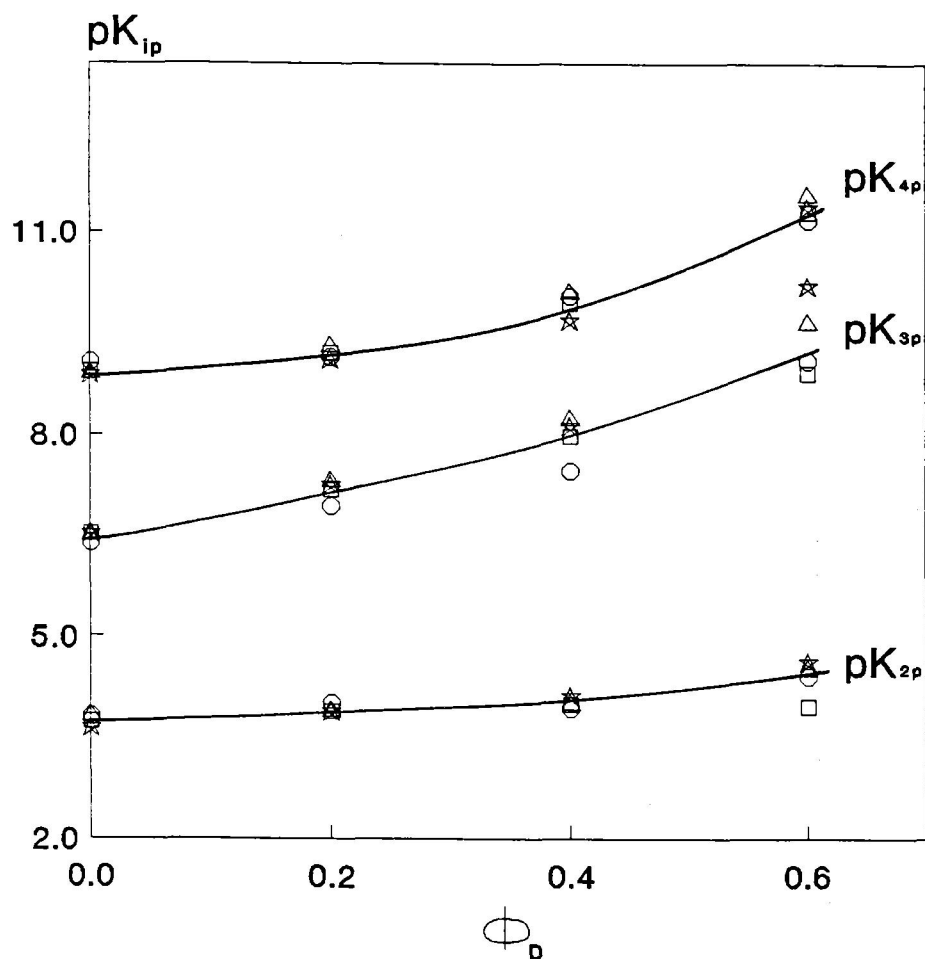


FIGURA 13. Variación de  $pK_{ip}$  frente a la fracción en volumen de dioxano ( $\Phi_D$ ). (□) valores obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas de PLP (sección 3. 4., tabla 1), (○) valores obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas del sistema en equilibrio PLP + n-hexilamina + base de Schiff (sección 4. 4., tabla 2), (☆) valores de  $pK_{ip}$  calculados por Cortijo et al (1988) mediante métodos espectrofotométricos y (Δ) valores obtenidos por los mismos autores mediante métodos potenciométricos.



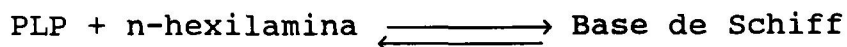
4. DETERMINACION DE CONSTANTES DE  
EQUILIBRIO DE IONIZACION Y  
DE FORMACION DE LA BASE DE SCHIFF  
DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL  
CON N-HEXILAMINA



4. 1. DETERMINACION POTENCIOMETRICA DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE IONIZACION Y DE FORMACION DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL CON N-HEXILAMINA.

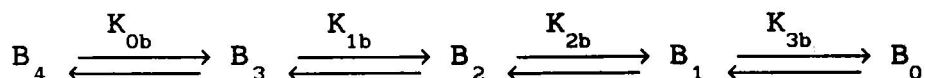
4. 1. 1. FUNDAMENTO TEORICO.

Las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas y de formación de la base de Schiff se determinarán a partir de la valoración potenciométrica (con una base fuerte, KOH) de una disolución de PLP, n-hexilamina y base de Schiff en equilibrio:



Hay que notar que la constante de formación aparente correspondiente a este equilibrio cambia con el pH. En el transcurso de la valoración se modificarán, por tanto, las proporciones relativas de PLP, de n-hexilamina y de base de Schiff, por lo que cabe esperar que los datos de volumen de valorante añadido *versus* pH contengan la información necesaria para el cálculo de las constantes de equilibrio de formación relevantes.

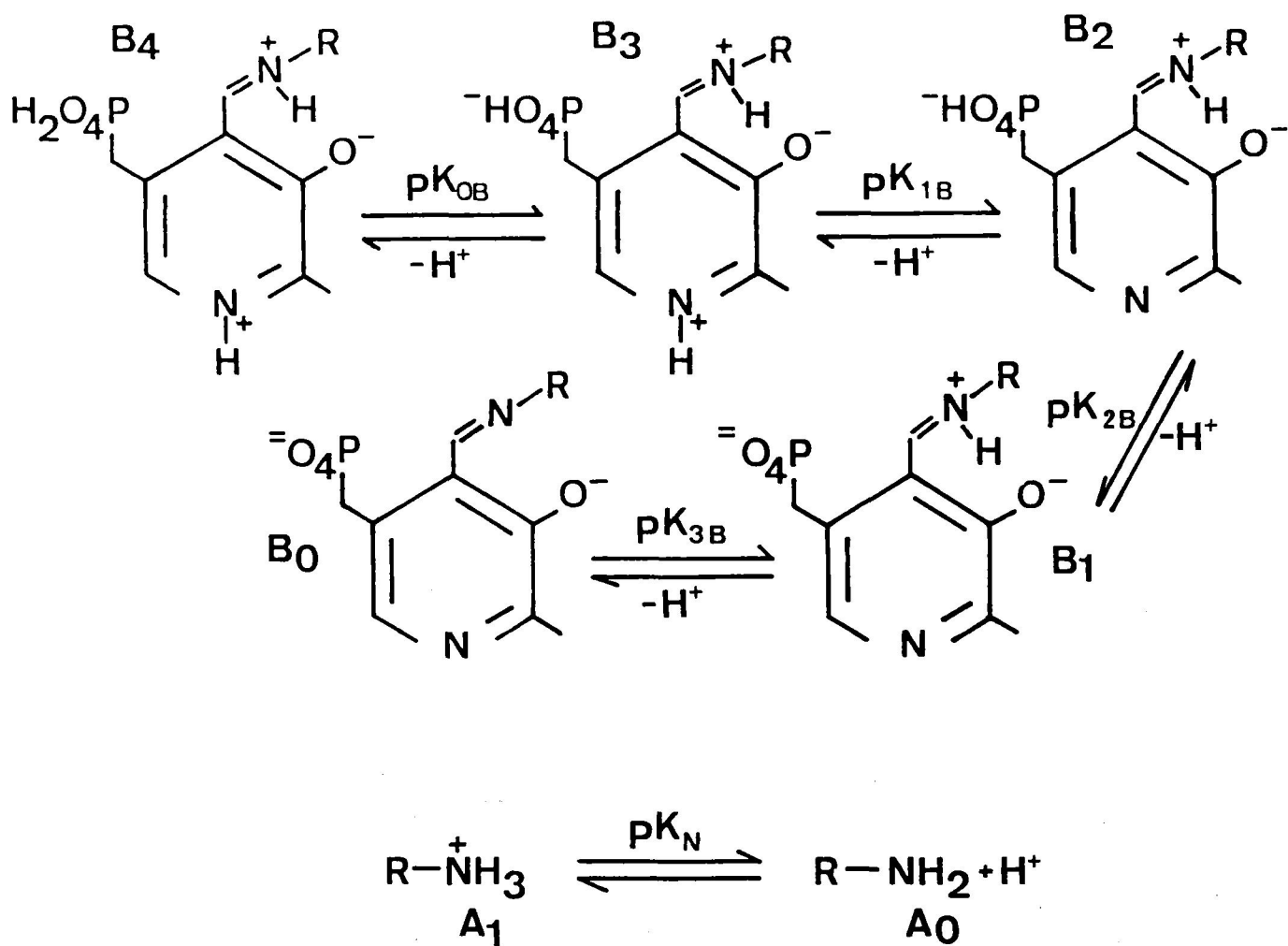
La ionización de la base de Schiff se puede describir como:



donde  $K_{0b}, \dots, K_{3b}$  son las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas y  $B_4, \dots, B_0$  son las especies iónicas de la base de Schiff con  $i$  protones lábiles. Al igual que el PLP cada especie iónica de la base de Schiff está constituida por varias formas tautoméricas en equilibrio (en el esquema 4 aparecen representadas las formas mayoritarias en agua). La forma predominante de las especies de la base de Schiff  $B_2$  y  $B_1$  en agua es la estructura cetoenamina que posee el oxígeno fenólico sin protonar y un grupo imino protonado. Esta forma está en equilibrio con su tautómero enolimina correspondiente. La forma cetoenamina predomina en agua y al disminuir la polaridad del medio aumenta la contribución de la enolimina (Heinert y Martell, 1962 y 1963; Matsushima y Martell, 1967; Arrio-Dupont, 1970; Shaltiel y Cortijo, 1970; Herscovitch et al., 1973; Metzler et al., 1980).

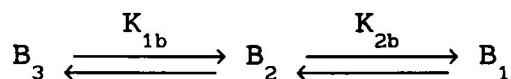
La primera ionización de la base de Schiff tiene lugar a pH muy ácido. Por otro lado, estudios llevados a cabo por Tobias y Kallen (1975), Sánchez-Ruiz, et al (1982) y Weng y Leussing (1983) ponen de manifiesto que la ionización entre las especies  $B_1$  y  $B_0$  tiene lugar a pH muy básico, claramente por encima de 11.5 en agua. Como el intervalo de pH de nuestros experimentos en agua se encuentra entre pH 3 y pH 11.5 (figura 14) aquí hemos considerado únicamente  $K_{1b}$  y  $K_{2b}$  determinando  $K_{3b}$  por métodos espectrofotométricos (sección 4. 2.), procedimiento que se ha utilizado también en las distintas mezclas agua-dioxano estudiadas. Más adelante (sección 4. 2.) se pondrá de manifiesto la bondad de esta suposición.

Por lo tanto, en el análisis de los experimentos



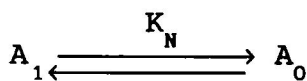
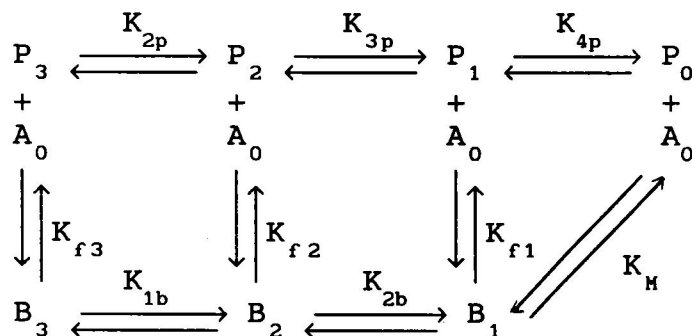
ESQUEMA 4. Formas tautoméricas mayoritarias de la base de Schiff y la n-hexilamina en agua pura.

potenciométricos, la ionización de la base de Schiff vendrá descrita por:



Seguidamente se deducirá la ecuación del volumen teórico de KOH añadido en cada instante de la valoración como una función del pH, de las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas del PLP, n-hexilamina y base de Schiff y de las constantes de equilibrio de formación de base de Schiff (ecuación 62).

En todo momento tenemos en el medio PLP, n-hexilamina y base de Schiff en un equilibrio que se modifica con el pH:



ESQUEMA 5

donde  $K_N$  es la constante de equilibrio de ionización de la n-hexilamina y  $A_i$  sus especies iónicas con  $i$  protones lábiles.  $K_{f1}$

representa la constante de equilibrio de formación individual de la especie  $B_i$  a partir de la reacción entre la correspondiente especie del PLP con el mismo número de protones,  $P_i$  y la especie de la n-hexilamina sin protonar,  $A_0$ .  $K_M$  es la constante de equilibrio de formación de  $B_i$  a partir de las especies iónicas del PLP y de la n-hexilamina sin protonar,  $P_0$  y  $A_0$  respectivamente.

Las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas de la base de Schiff y de la n-hexilamina vienen definidas por:

$$K_{1b} = \frac{a_{b2}}{a_{b3}} \cdot a_H = \frac{[B_2]}{[B_3]} \cdot \frac{\gamma_{b2}}{\gamma_{b3}} \cdot a_H \quad (26)$$

$$K_{2b} = \frac{a_{b1}}{a_{b2}} \cdot a_H = \frac{[B_1]}{[B_2]} \cdot \frac{\gamma_{b1}}{\gamma_{b2}} \cdot a_H \quad (27)$$

$$K_N = \frac{a_{a0}}{a_{a1}} \cdot a_H = \frac{[A_0]}{[A_1]} \cdot \frac{\gamma_{a0}}{\gamma_{a1}} \cdot a_H \quad (28)$$

donde  $a_{b1}$  y  $a_{a1}$  son las actividades de las especies  $B_i$  y  $A_i$ ,  $\gamma_{b1}$  y  $\gamma_{a1}$  sus coeficientes de actividad en la escala molar y  $[B_i]$  y  $[A_i]$  sus concentraciones.

Las constantes de formación individuales se pueden expresar como:

$$K_{f1} = \frac{a_{b1}}{a_{p1} \cdot a_{a0}} \quad (29)$$

$$K_{f2} = \frac{a_{b2}}{a_{p2} \cdot a_{a0}} \quad (30)$$

$$K_{f3} = \frac{a_{b3}}{a_{p3} \cdot a_{a0}} \quad (31)$$

$K_M$  será:

$$K_M = \frac{a_{b1}}{a_{p0} \cdot a_{a0} \cdot a_H} = \frac{[B_1]}{[P_0] \cdot [A_0] \cdot a_H} \cdot \frac{\gamma_{b1}}{\gamma_{p0} \cdot \gamma_{a0}} \quad (32)$$

Se define una constante de equilibrio aparente,  $K_{pH}$ , que depende del pH y de la fuerza iónica, como la relación de las concentraciones totales de todos los componentes:

$$K_{pH} = \frac{[B]_t}{[P]_t \cdot [A]_t} \quad (33)$$

donde  $[P]_t$ ,  $[B]_t$  y  $[A]_t$  son las concentraciones totales de PLP (ecuación 8), base de Schiff y n-hexilamina respectivamente:

$$[B]_t = [B_1] + [B_2] + [B_3] \quad (34)$$

$$[A]_t = [A_0] + [A_1] \quad (35)$$

Todas las constantes de equilibrio, tanto de ionización como de formación que aparecen en el esquema 5, no son independientes entre sí pudiéndose describir el sistema en función de un número menor de constantes de equilibrio independientes. Aquí se han elegido las constantes de ionización,  $K_N$ ,  $K_{2p}$ ,  $K_{3p}$ ,  $K_{4p}$ ,  $K_{1b}$  y  $K_{2b}$ , y la constante de equilibrio  $K_M$ . El resto de constantes se



pueden expresar fácilmente en función de éstas:

$$K_{f1} = K_M \cdot K_{4p} \quad (36)$$

$$K_{f2} = \frac{K_{f1} \cdot K_{3p}}{K_{2b}} \quad (37)$$

$$K_{f3} = \frac{K_{f2} \cdot K_{2p}}{K_{1b}} \quad (38)$$

Las fracciones de las especies iónicas de la base de Schiff,  $b_i$ , referidas a la concentración total de base de Schiff serán:

$$b_i = \frac{[B_i]}{[B]_t} \quad (39)$$

y análogamente para la n-hexilamina:

$$a_i = \frac{[A_i]}{[A]_t} \quad (40)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones 26-28, 34 y 35 y calculando los  $\gamma_{bi}$  y  $\gamma_{ai}$  de la misma forma que los  $\gamma_{pi}$ , es decir como el  $\gamma_{\pm}$  del ácido clorhídrico correspondiente a una disolución de la misma fuerza iónica y disolvente elevado al cuadrado de la carga de la especie iónica en cuestión (ecuación 11), tenemos que las fracciones de las especies iónicas de la base de Schiff y de la n-hexilamina en términos de las constantes de ionización vendrán dadas por:

$$b_1 = \frac{Z_{b1}}{Z_b} \quad (41)$$

$$a_1 = \frac{Z_{a1}}{Z_a} \quad (42)$$

donde

$$Z_{b1} = 1 \quad (43)$$

$$Z_{b2} = \frac{a_H}{K_{2b}} \cdot (\gamma_{\pm})^3 \quad (44)$$

$$Z_{b3} = \frac{a_H^2}{K_{1b} \cdot K_{2b}} \cdot (\gamma_{\pm})^4 \quad (45)$$

$$Z_b = \sum_{i=1}^3 Z_{bi} = 1 + Z_{b2} + Z_{b3} \quad (46)$$

$$Z_{a0} = 1 \quad (47)$$

$$Z_{a1} = \frac{a_H}{K_N} \cdot (\gamma_{\pm})^{-1} \quad (48)$$

$$Z_a = 1 + Z_{a1} \quad (49)$$

La constante de equilibrio aparente,  $K_{pH}$  (ecuación 33), la podemos expresar en función de la concentración de las especies iónicas:

$$K_{pH} = \frac{[B_1] + [B_2] + [B_3]}{([P_0] + [P_1] + [P_2] + [P_3]) \cdot ([A_0] + [A_1])} \quad (50)$$

es decir:

$$K_{\text{pH}} = \frac{[B_1]}{[P_0] \cdot [A_0]} \cdot \frac{Z_b}{Z_p \cdot Z_a} \quad (51)$$

Sustituyendo  $K_M$  (ecuación 32) en  $K_{\text{pH}}$  (ecuación 51) y teniendo en cuenta los coeficientes de actividad (ecuación 11) tenemos:

$$K_{\text{pH}} = K_M \cdot a_H \cdot \frac{Z_b}{Z_p \cdot Z_a} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (52)$$

La expresión de  $K_{\text{pH}}$  queda así finalmente definida en función de  $K_M$ , del pH y de las constantes de ionización de la base de Schiff, del PLP y de la n-hexilamina.

Los experimentos se han realizado partiendo de una disolución inicial de PLP y n-hexilamina de igual concentración (sección 4.1.2.), estando el PLP de partida en forma neutra y la n-hexilamina en forma de clorhidrato. A esta disolución se añadía KOH como si se tratara de una valoración potenciométrica simple (sección 4.1.2). En todo momento el balance de carga es el siguiente:

$$[K^+] + [H^+] + [A_1] = [OH^-] + [Cl^-] + [P_2] + 2[P_1] + 3[P_0] + [B_2] + 2[B_1] \quad (53)$$

Despejando  $[K^+]$ :

$$[K^+] = [OH^-] - [H^+] + [Cl^-] + [P]_t \cdot Q_p + [B]_t \cdot Q_b + [A]_t \cdot Q_a \quad (54)$$

y definiendo  $Q_b$  (carga media que aporta la base de Schiff por molécula de base de Schiff) y  $Q_a$  (carga media que aporta la n-hexilamina por molécula de n-hexilamina) análogamente a  $Q_p$  (ecuación 9) como:

$$Q_b = 2b_1 + b_2 \quad (55)$$

$$Q_a = -a_1 \quad (56)$$

siendo  $[A]_t \cdot Q_a$  las cargas totales aportadas por la n-hexilamina y  $[B]_t \cdot Q_b$  las aportadas por la base de Schiff.

En todo instante se cumplirá que:

$$[P]_t = [A]_t \quad (57)$$

y que:

$$c_t = [P]_t + [B]_t = \frac{a \cdot v_0}{v + v_0} \quad (58)$$

siendo  $c_t$  la concentración total,  $a$  la concentración inicial de PLP y n-hexilamina,  $v$  el volumen de KOH añadido y  $v_0$  el volumen inicial.

Introduciendo en la ecuación de  $K_{pH}$  (33),  $[P]_t$  y  $[A]_t$  en términos de  $[B]_t$  y despejando  $[B]_t$  tenemos que:

$$[B]_t = \frac{1}{2 \cdot K_{pH}} + c_t - \left( \frac{1}{4 \cdot K_{pH}^2} + \frac{c_t}{K_{pH}} \right)^{1/2} \quad (59)$$

Teniendo en cuenta las constantes de ionización (ecuaciones 26-28) y las ecuaciones 41 a 49 tenemos que  $Q_b$  y  $Q_a$  son:

$$Q_b = \frac{2 + Z_{b2}}{Z_b} \quad (60)$$

$$Q_a = - \frac{Z_{a1}}{Z_a} \quad (61)$$

Introduciendo el volumen de KOH añadido en la ecuación 54 y teniendo en cuenta todas las expresiones calculadas tenemos:

$$v = v_0 \cdot \frac{[OH^-] - [H^+] + a \cdot Q_{pa} + [B]_t \cdot Q_{bpa}}{b - [OH^-] + [H^+] - [B]_t \cdot Q_{bpa}} \quad (62)$$

donde  $b$  es la concentración de la disolución de KOH y

$$Q_{pa} = 1 + Q_p + Q_a \quad (63)$$

$$Q_{bpa} = Q_b - Q_p - Q_a \quad (64)$$

siendo  $Q_p$ ,  $Q_a$ , y  $Q_b$  la carga media aportada por molécula de PLP, n-hexilamina y base de Schiff, respectivamente (ecuaciones 9, 56 y 55).

La ecuación 62, junto con las ecuaciones 52 y 59, nos da la expresión del volumen teórico de KOH como una función del pH, de

todas las constantes de ionización y de  $K_M$  y nos permite determinar estas constantes mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos experimentales. Conviene señalar aquí que por necesidades del programa de ajuste la ecuación que se ha utilizado para calcular el volumen no es la ecuación 62 sino otra equivalente (ecuación 70) como se detallará más adelante (sección 4. 1. 3.).

#### 4. 1. 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El tipo de recipiente donde se han realizado las valoraciones, el sistema empleado para dosificar el agente valorante, KOH, y el orden de volúmenes añadidos del mismo ya han sido descritos en la sección 3. 2.

La disolución de partida contenía concentraciones equimoleculares de PLP y n-hexilamina (en forma de clorhidrato) en la mezcla agua-dioxano correspondiente. En todos los casos el volumen inicial fué de 2 mls.

Simultáneamente a cada adición de KOH se agitaba la disolución hasta conseguir homogeneidad y se ponía en marcha el cronómetro tomándose medidas de la variación del pH con el tiempo (sin agitación) hasta que se alcanzaba el equilibrio. El análisis de esta variación se hará en una sección posterior (sección 6).

En agua pura y en la mezcla del 0.4 de fracción en volumen de dioxano se han realizado cinco valoraciones con distinta concentración inicial. En las mezclas del 0.2 y 0.6 los experimentos han sido cuatro. Las concentraciones de partida

estaban comprendidas entre  $4 \cdot 10^{-3}$  M y  $3 \cdot 10^{-2}$  M para agua pura y la mezcla del 0.2 de fracción en volumen de dioxano, entre  $2 \cdot 10^{-3}$  M y  $2 \cdot 10^{-2}$  M para la mezcla del 0.4 y entre  $1.6 \cdot 10^{-3}$  y  $1 \cdot 10^{-2}$  M para la mezcla del 0.6 (figuras 14-17).

El hecho de que tanto en las valoraciones de PLP como en las del PLP y n-hexilamina el intervalo de concentración sea más pequeño al aumentar la proporción de dioxano se debe a la menor solubilidad del PLP al disminuir la polaridad del medio. Para determinar las concentraciones adecuadas se hicieron distintas pruebas de solubilidad en cada mezcla agua-dioxano.

#### 4. 1. 3. ANALISIS DE DATOS.

De forma análoga al caso del PLP la expresión del volumen teórico de KOH (ecuación 62) nos permite obtener las constantes de equilibrio de ionización y de formación de la base de Schiff con un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos experimentales de pH y volumen. Hemos utilizado el P.G.P. (sección 3. 3.) pero en este caso la subrutina que hay que escribir es bastante más complicada. Esta permite el cálculo del volumen (variable dependiente) en función del pH (variable independiente), de los parámetros ajustables ( $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$ ) y de la concentración inicial de PLP o n-hexilamina (variable independiente adicional).

En la ecuación del volumen teórico (62) aparece  $\gamma_{\pm}$  que lo podremos calcular si conocemos la fuerza iónica de la disolución que viene dada por:

$$I = \frac{1}{2} \left[ [H^+] + [K^+] + [A_1] + [OH^-] + [Cl^-] + [P_2] + 4[P_1] + 9[P_0] + [B_2] + 4[B_1] \right] \quad (65)$$

y teniendo en cuenta la electroneutralidad (ecuación 53):

$$I = [OH^-] + c_t + [P]_t \cdot I_p + [B]_t \cdot I_b \quad (66)$$

donde  $[B]_t \cdot I_b$  es la fuerza iónica total aportada por la base de Schiff.

Por otro lado,  $I_b$  es igual a

$$I_b = 3 \cdot b_1 + b_2 \quad (67)$$

e  $I_p$  viene dada por la ecuación 23.

Sustituyendo las expresiones de las especies iónicas (ecuación 41) tenemos:

$$I_b = \frac{3 + Z_{b2}}{Z_b} \quad (68)$$

Vemos, pues, que en la expresión de la fuerza iónica intervienen  $\gamma_{\pm}$  y las concentraciones totales de PLP y base de Schiff que a su vez están determinadas por la constante de equilibrio aparente  $K_{pH}$  y por el volumen total ya que dependen de  $c_t$  (ecuaciones 57-59).

Como en la ecuación del volumen teórico (62) interviene también  $[B]_t$  hay que plantear un ciclo iterativo que calcule el volumen de KOH añadido.



En cualquier momento de la valoración el número de moles de  $K^+$ ,  $n$ , presentes en el medio será:

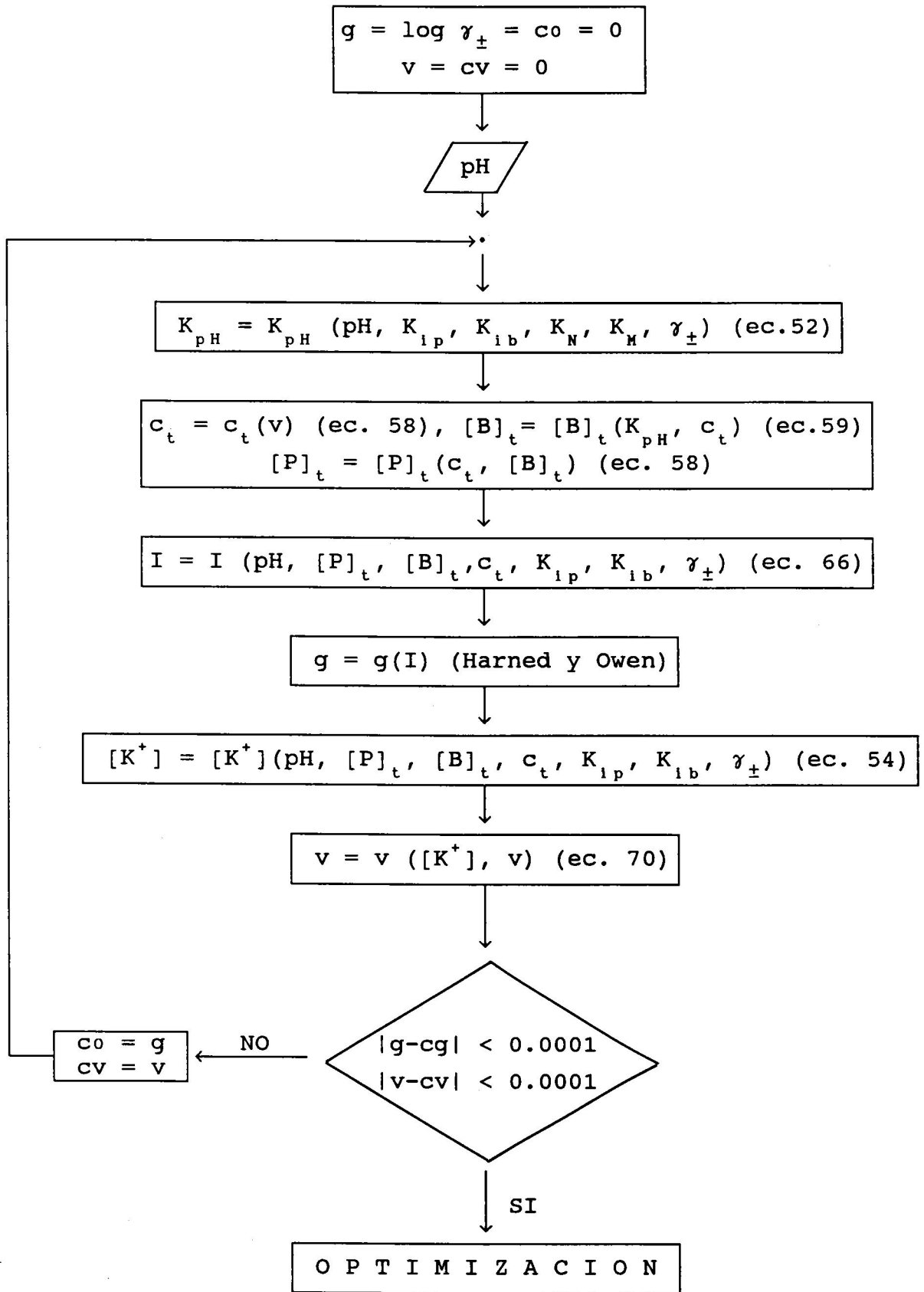
$$n = [K^+].(v_0 + v) \quad (69)$$

Por otro lado, el volumen de KOH añadido debe ser siempre igual a:

$$v = \frac{n}{b} \quad (70)$$

siendo  $b$  la concentración de la disolución de KOH como se ha indicado anteriormente.

Nuestro procedimiento iterativo comienza suponiendo en el primer ciclo  $\gamma_{\pm} = 1$  y  $v = 0$ . Con este volumen y con el valor que los parámetros tengan en ese momento del ajuste se calcula  $c_t$  (ecuación 58),  $[B]_t$  (59),  $[P]_t$  (58) y la fuerza iónica (66). Con el valor de  $I$  obtenemos  $\gamma_{\pm}$  a partir de los datos de Harned y Owen (apéndice I) y éste será el  $\gamma_{\pm}$  que se utilizará de partida en el segundo ciclo. Teniendo en cuenta la electroneutralidad calculamos  $[K^+]$  (ecuación 54) y sustituyendo este valor en la ecuación 69 obtenemos el número de moles con el cual (ecuación 70) podemos calcular el volumen de KOH añadido. Este valor de  $v$  será el utilizado de partida en el segundo ciclo. El procedimiento iterativo finaliza cuando en dos ciclos sucesivos la diferencia entre los  $\gamma_{\pm}$  y los  $v$  calculados es menor de 0.0001 (en el esquema 6 se muestra el diagrama de flujo de la subrutina y en el apéndice II. 2. su código fuente). Una vez finalizado el procedimiento iterativo para cada pH con el valor que los parámetros tengan en



ESQUEMA 6

ese instante del ajuste se pasa al proceso de optimización.

De forma análoga al caso del PLP se hicieron ajustes simultáneos con todas las valoraciones en cada mezcla agua-dioxano obteniendo las constantes de equilibrio de ionización y de formación de la base de Schiff que mejor ajustan la expresión del volumen teórico a nuestros datos experimentales obtenidos en diferentes condiciones de fuerza iónica.

#### 4. 1. 4. RESULTADOS.

Mediante el método descrito en la sección anterior hemos determinado las constantes de ionización de la base de Schiff formada entre el 5'-fosfato de piridoxal y la n-hexilamina en agua y en las mezclas de 0.2, 0.4 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

En el programa hemos introducido como parámetros de ajuste los  $pK$  del PLP, los  $pK$  de la base de Schiff y el  $pK_N$ . En todos los casos se realizaron dos tipos de ajustes: el primero dejando libres todos los parámetros y el segundo fijando los  $pK_{ip}$  en los valores obtenidos anteriormente (sección 3. 4.). No se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de ajustes y, de hecho, los nuevos valores de los  $pK_{ip}$  obtenidos son sólo ligeramente diferentes a los procedentes de los ajustes de las valoraciones de PLP (figura 13, tabla 2). Los valores de  $pK_N$  y  $pK_w$  se tomaron de Llor, et al (1989a) y Sánchez-Ruiz, et al (1984a) respectivamente, (se realizaron algunos ajustes dejando  $pK_N$  y  $pK_w$  como parámetros libres observándose que el resultado final era

TABLA 2. Valores óptimos de  $pK_{1p}$ ,  $pK_{1b}$  y  $pK_H$  obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas del sistema en equilibrio PLP + n-hexilamina + base de Schiff a 25 °C en mezclas agua-dioxano.  $\Phi_D$  indica la fracción en volumen de dioxano.

$\Phi_D$	$pK_{2p}$	$pK_{3p}$	$pK_{4p}$	$pK_{1b}$	$pK_{2b}$	$pK_H$
0	3.84	6.32	9.04	5.83	6.87	-14.65
0.2	3.97	6.93	9.23	5.90	7.28	-14.72
0.4	3.94	7.50	10.07	5.35	7.87	-15.30
0.6	4.36	9.00	11.23	5.82	9.43	-16.81

prácticamente igual que en los ajustes anteriores y que en ningún caso ni  $pK_N$  ni  $pK_w$  variaban respecto a los de las referencias citadas en más de 0.01).

Los resultados de los ajustes se muestran en las figuras 14-17 donde puede observarse que las curvas teóricas coinciden bastante bien con los datos experimentales.

En las figuras 18-21 hemos representado la variación de la fuerza iónica en el transcurso de la valoración en función del pH, en estas figuras podemos observar que las valoraciones se llevaron a cabo en condiciones muy distintas de fuerza iónica y que ésta aumenta significativamente a lo largo de las mismas.

En las figuras 22-25 se ha representado, para cada valoración, la variación de las fracciones de las especies iónicas del PLP,  $f_{pi}$ , y de la base de Schiff,  $f_{bi}$ , referidas a la concentración total,  $c_t$  (concentración de PLP total + concentración de base de Schiff total, ecuación 58), frente al pH calculadas a partir de los  $pK_{ib}$ ,  $pK_{ip}$  y  $pK_M$  obtenidos. Estas fracciones vienen dadas por:

$$f_{pi} = \frac{[P_i]}{c_t} \quad (71)$$

$$f_{bi} = \frac{[B_i]}{c_t} \quad (72)$$

Observamos, para cada mezcla, como a medida que la concentración inicial de PLP y n-hexilamina es más pequeña las fracciones de las especies iónicas de la base de Schiff disminuyen con respecto a las de PLP, si bien, en todas las mezclas, existen valoraciones en

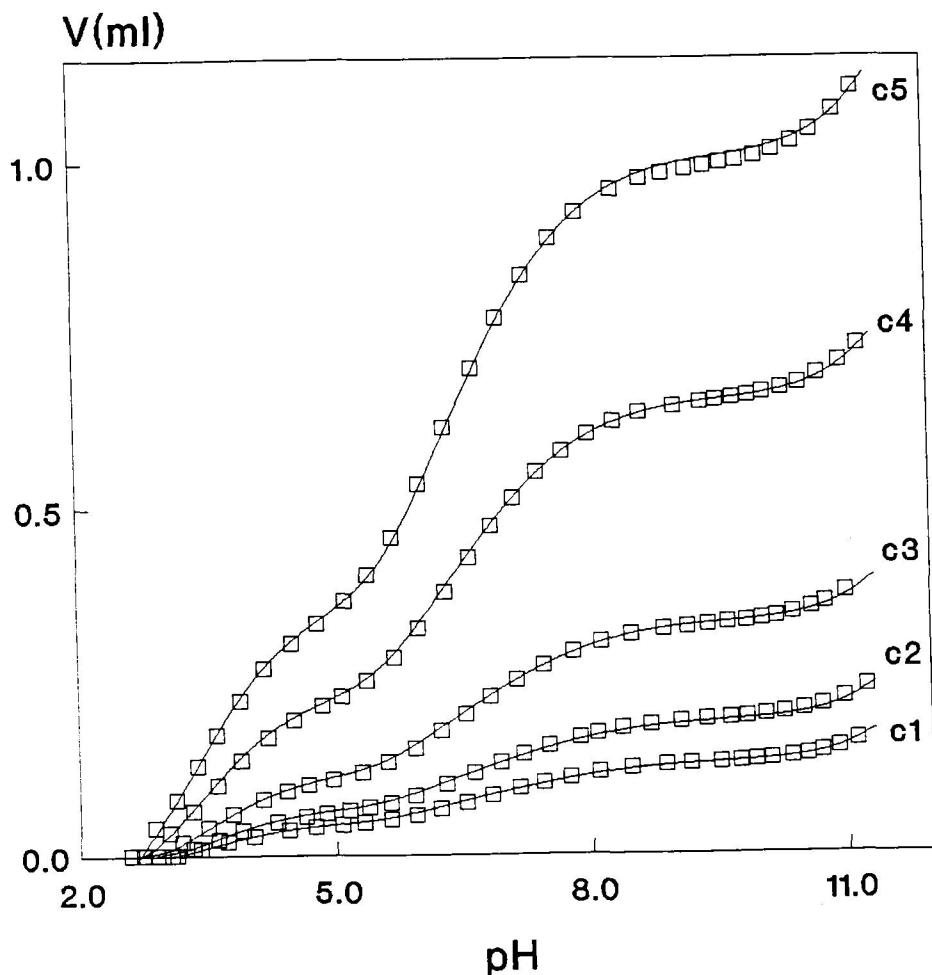


FIGURA 14. Volumen de KOH añadido a una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en agua pura a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 62 y los valores de  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). (□) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:  
 $c_1=3.93 \times 10^{-3}$  M,  $c_2=5.72 \times 10^{-3}$  M,  $c_3=9.92 \times 10^{-3}$  M,  
 $c_4=1.96 \times 10^{-2}$  M y  $c_5=3.01 \times 10^{-2}$  M.

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.79 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

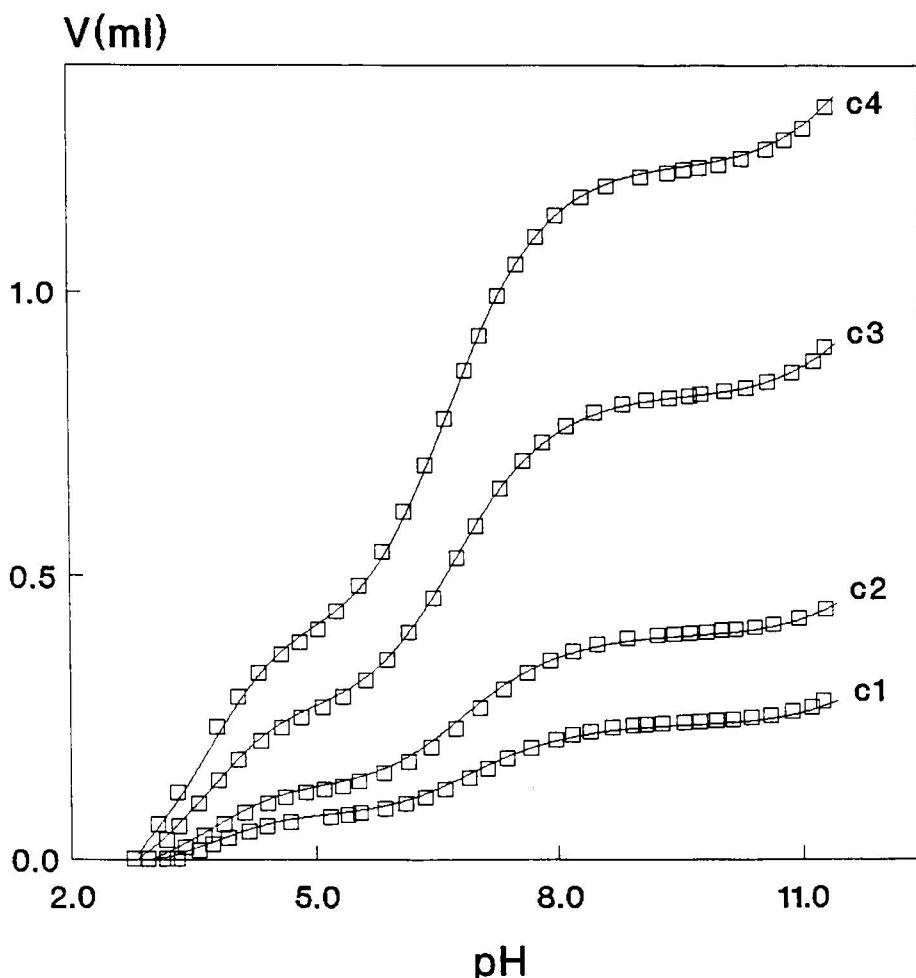


FIGURA 15. Volumen de KOH añadido a una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 62 y los valores de  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). (□) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

$$c_1 = 5.93 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 9.88 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 2.05 \times 10^{-2} \text{ M} \text{ y} \\ c_4 = 3.08 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.51 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos.

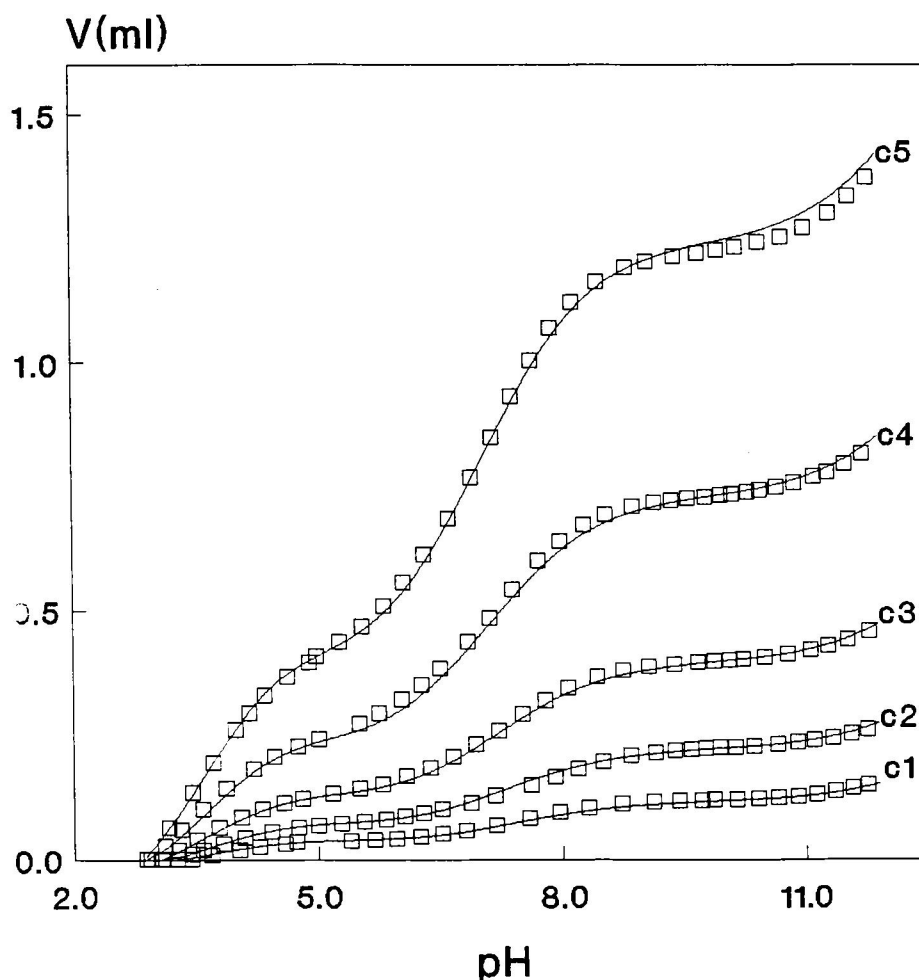


FIGURA 16. Volumen de KOH añadido a una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 62 y los valores de  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). (□) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

$$c_1 = 2.04 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 3.86 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 6.84 \times 10^{-3} \text{ M},$$

$$c_4 = 1.26 \times 10^{-2} \text{ M} \text{ y } c_5 = 2.14 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.03 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos.



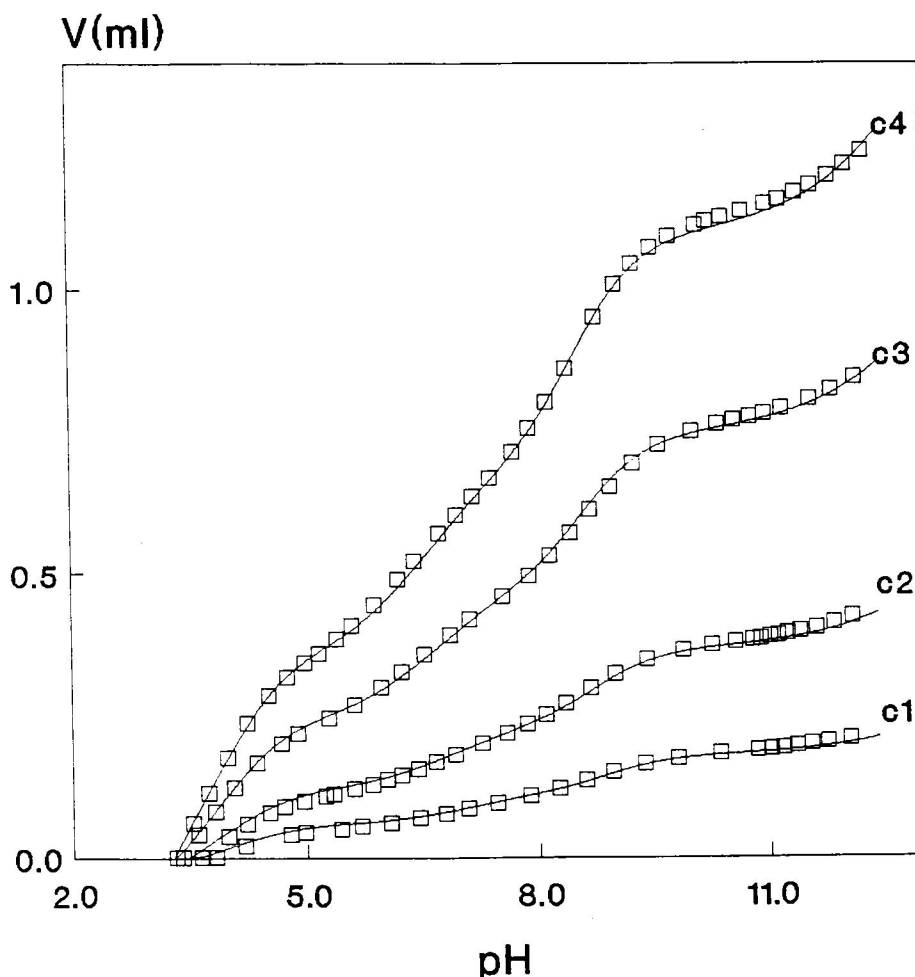


FIGURA 17. Volumen de KOH añadido a una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio en el transcurso de la valoración potenciométrica frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por la ecuación 62 y los valores de  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). ( $\square$ ) datos experimentales. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

$$c_1 = 1.59 \times 10^{-3} \text{ M}, c_2 = 3.28 \times 10^{-3} \text{ M}, c_3 = 6.67 \times 10^{-3} \text{ M y} \\ c_4 = 9.79 \times 10^{-3} \text{ M.}$$

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $5.32 \times 10^{-2} \text{ M}$  en todos los casos.

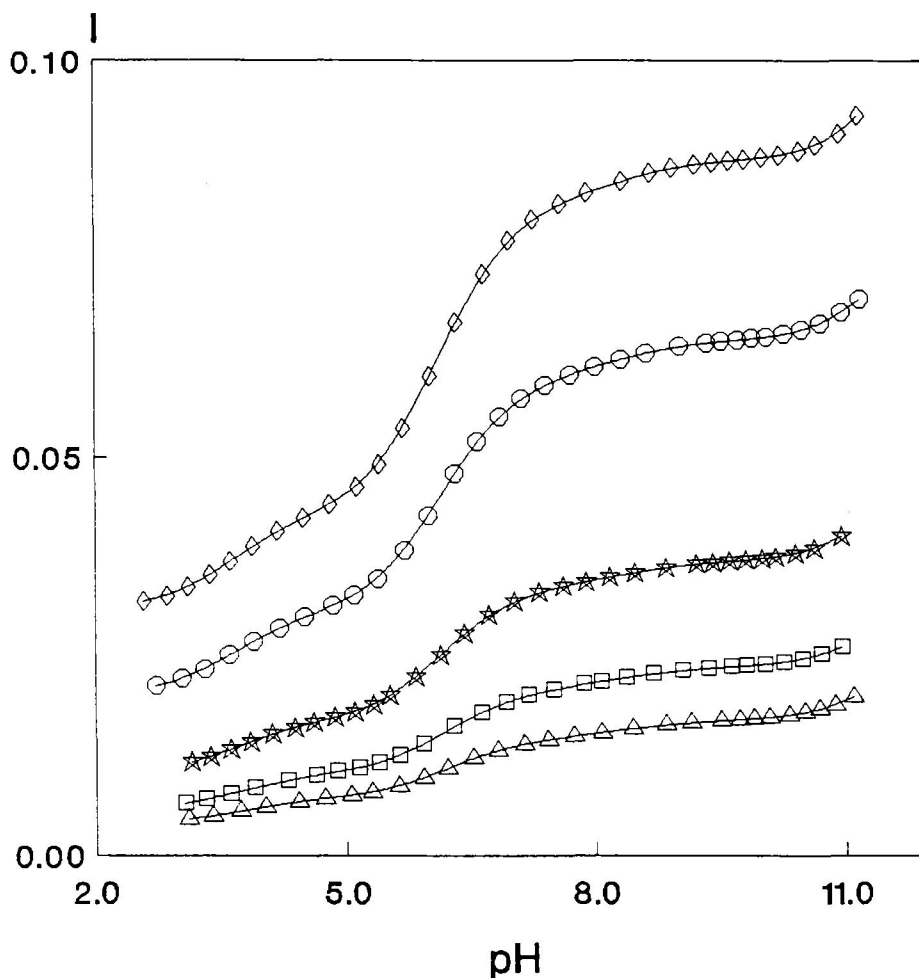


FIGURA 18. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente al pH en agua pura a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

$$\Delta = 3.93 \times 10^{-3} \text{ M}, \square = 5.72 \times 10^{-3} \text{ M}, \star = 9.92 \times 10^{-2} \text{ M},$$

$$\circ = 1.96 \times 10^{-2} \text{ M y } \diamond = 3.01 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.79 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 14.

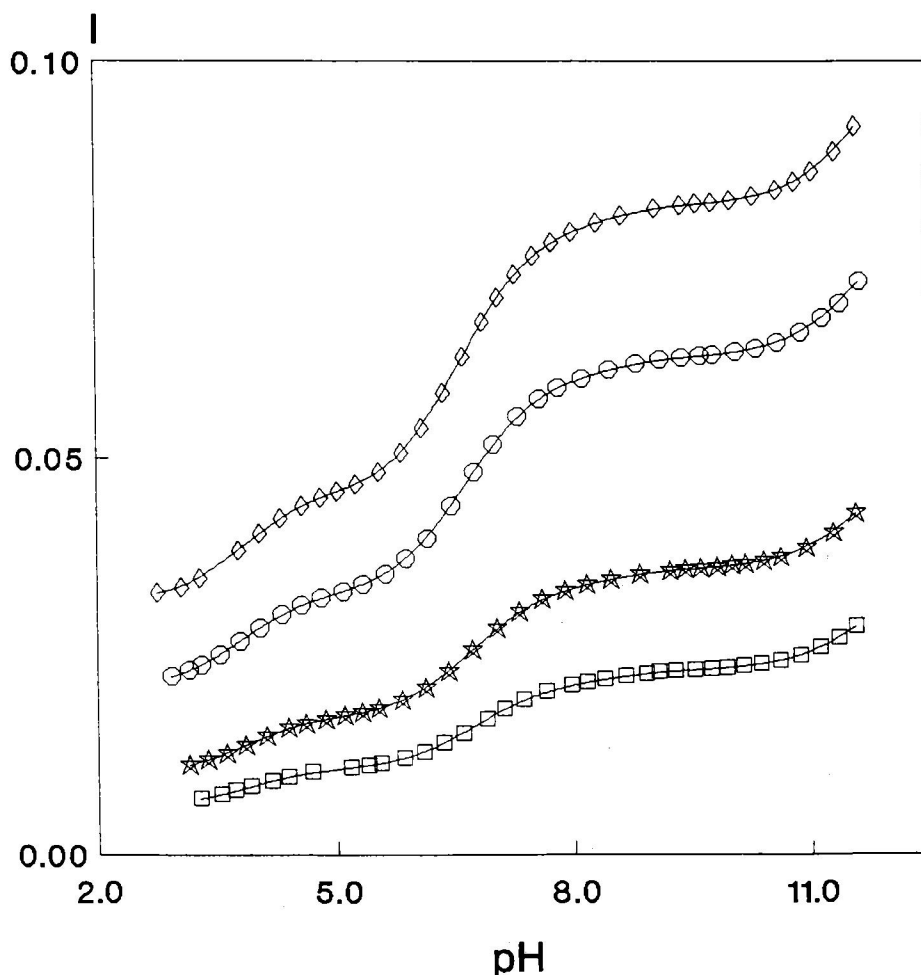


FIGURA 19. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

□ =  $5.93 \times 10^{-3}$  M, ☆ =  $9.88 \times 10^{-3}$  M, ○ =  $2.05 \times 10^{-2}$  M y  
 ◇ =  $3.08 \times 10^{-2}$  M.

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.51 \times 10^{-1}$  M en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 15.

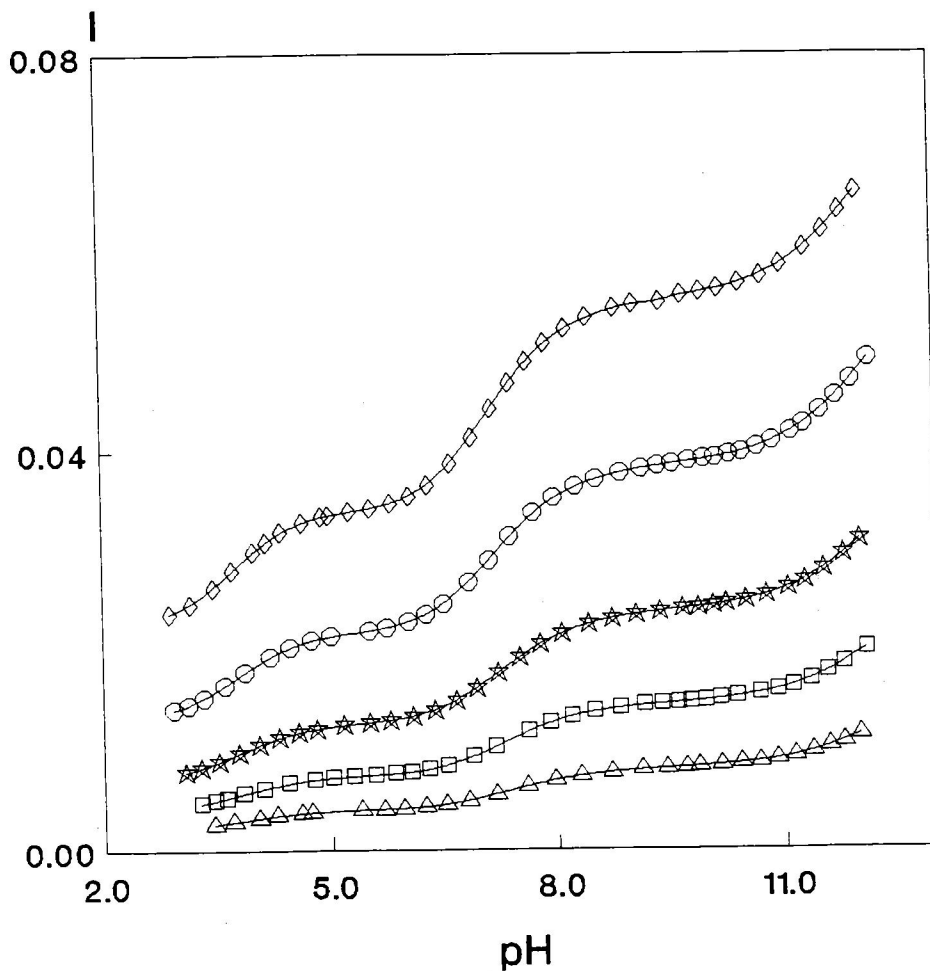


FIGURA 20. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

$$\Delta = 2.04 \times 10^{-3} \text{ M}, \quad \square = 3.86 \times 10^{-3} \text{ M}, \quad \star = 6.84 \times 10^{-3} \text{ M},$$

$$\circ = 1.26 \times 10^{-2} \text{ M} \text{ y } \diamond = 2.14 \times 10^{-2} \text{ M}.$$

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $1.03 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 16.

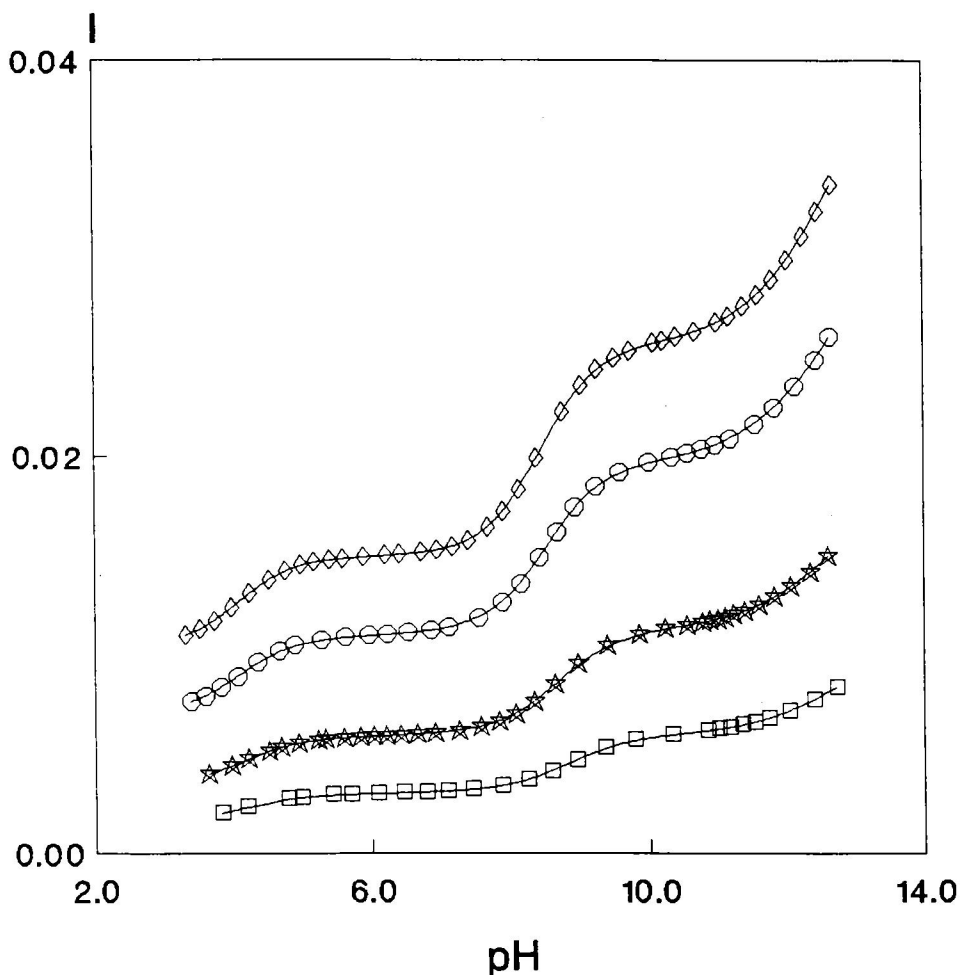
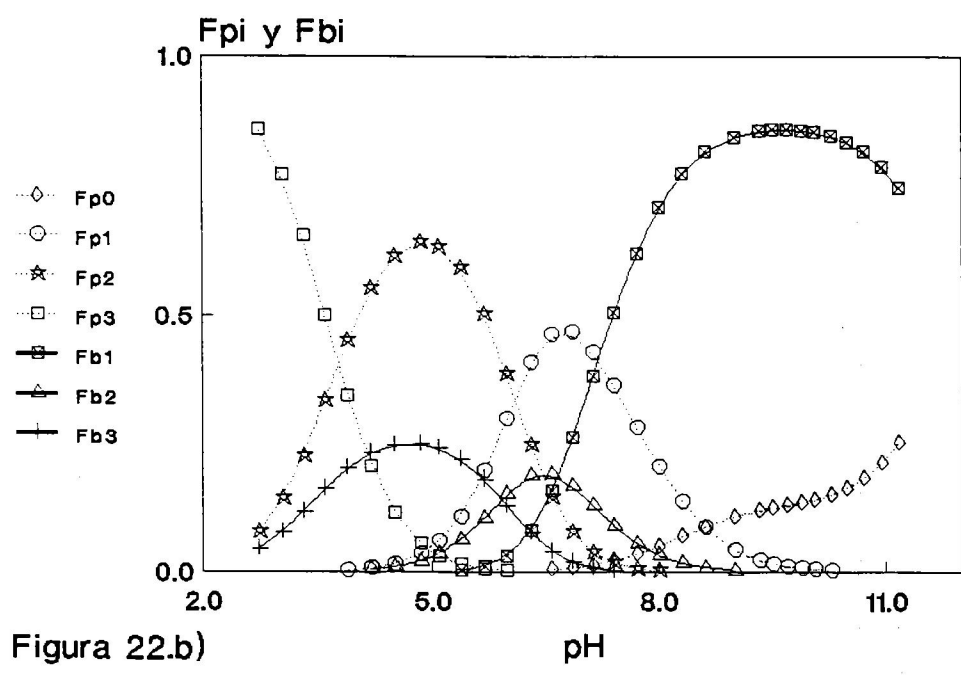
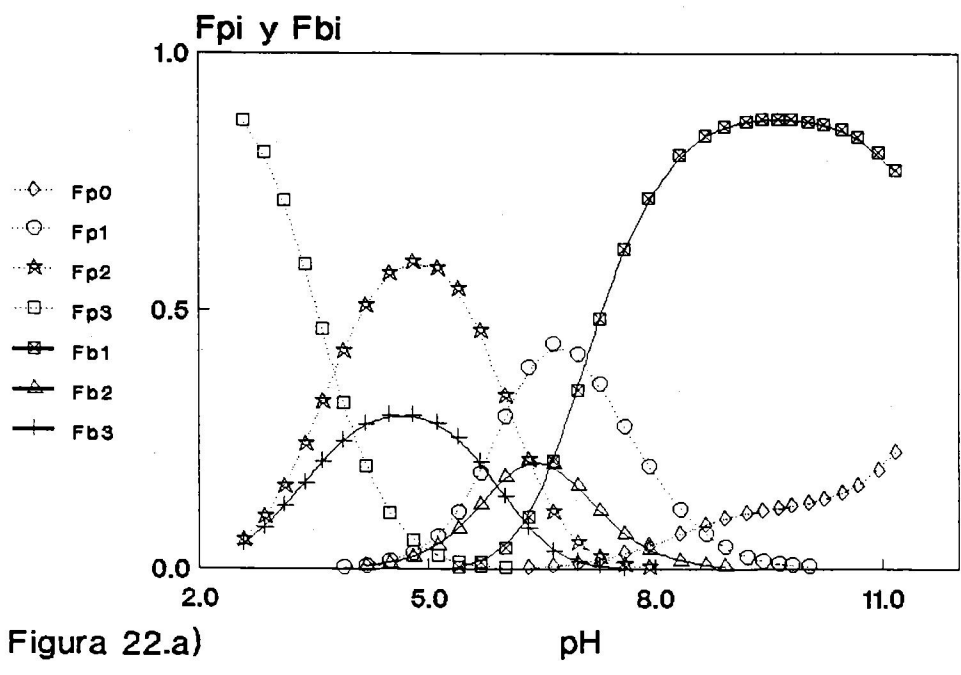
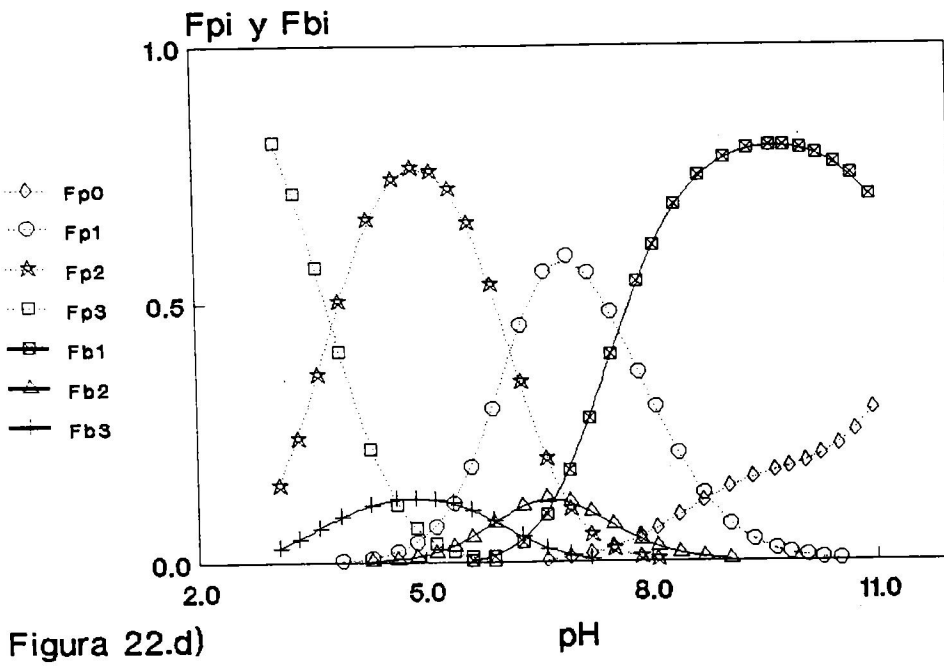
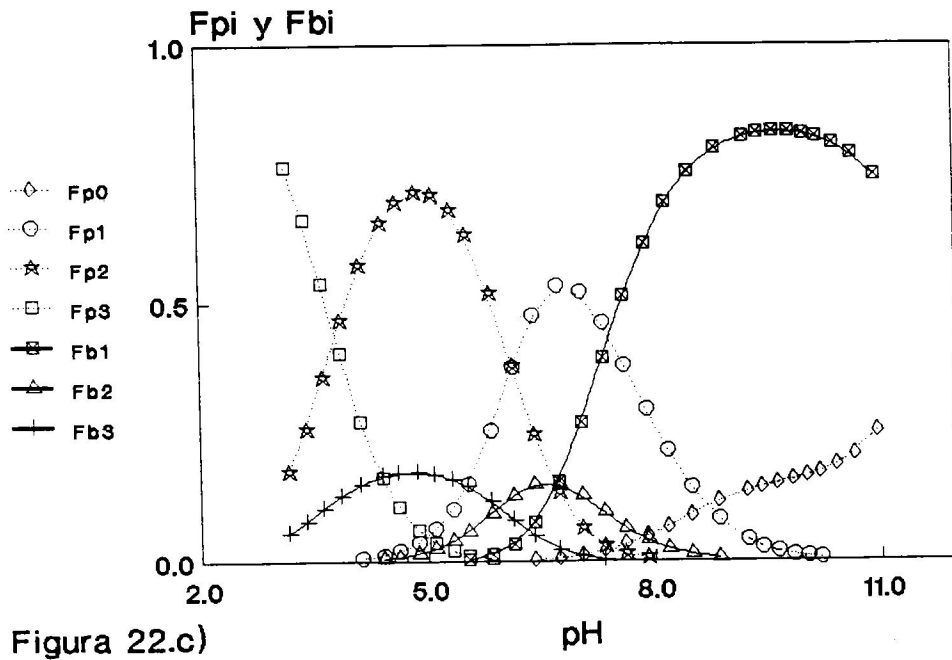


FIGURA 21. Variación de la fuerza iónica de la disolución en el transcurso de la valoración potenciométrica de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

□ =  $1.59 \times 10^{-3}$  M, ☆ =  $3.28 \times 10^{-3}$  M, ○ =  $6.67 \times 10^{-3}$  M y  
 ◇ =  $9.79 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de KOH de la disolución valorante es  $5.32 \times 10^{-2}$  M en todos los casos. Esta variación de fuerza iónica corresponde a las valoraciones de la figura 17.





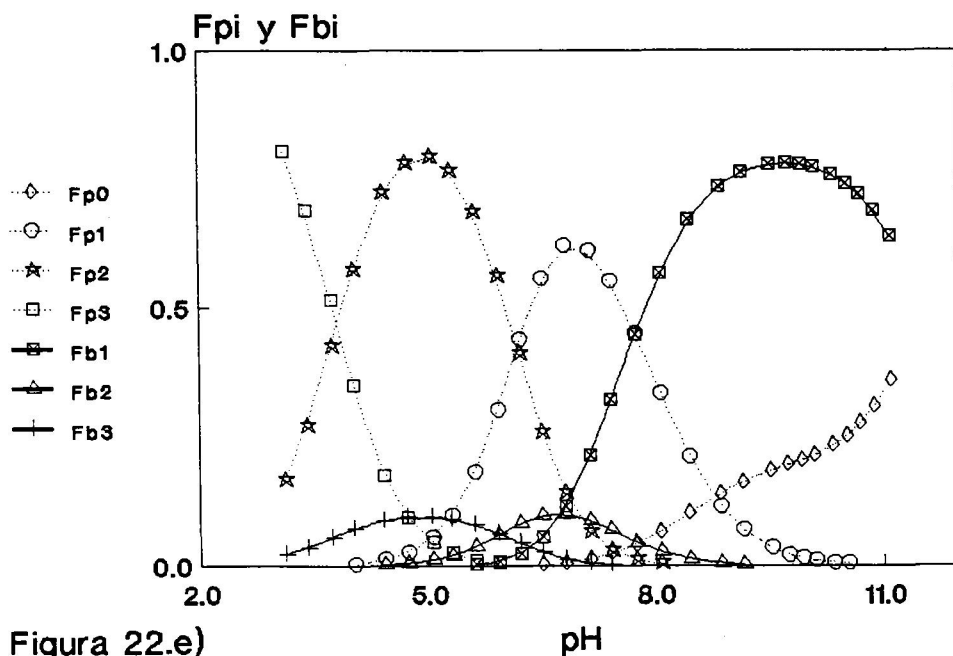


FIGURA 22. Fracciones de las especies iónicas del PLP,  $f_{pi}$ , y de la base de Schiff,  $f_{bi}$ , referidas a la concentración total (suma de las concentraciones de PLP y base de Schiff) frente al pH en agua pura a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

Fig. 22.a =  $3.01 \times 10^{-2}$  M, Fig. 22.b =  $1.96 \times 10^{-2}$  M,  
 Fig. 22.c =  $9.92 \times 10^{-2}$  M, Fig. 22.d =  $5.72 \times 10^{-3}$  M y  
 Fig. 22.e =  $3.93 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.79 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 14 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_5$ , b  $\longrightarrow$   $c_4$ , c  $\longrightarrow$   $c_3$ , d  $\longrightarrow$   $c_2$  y e  $\longrightarrow$   $c_1$ .



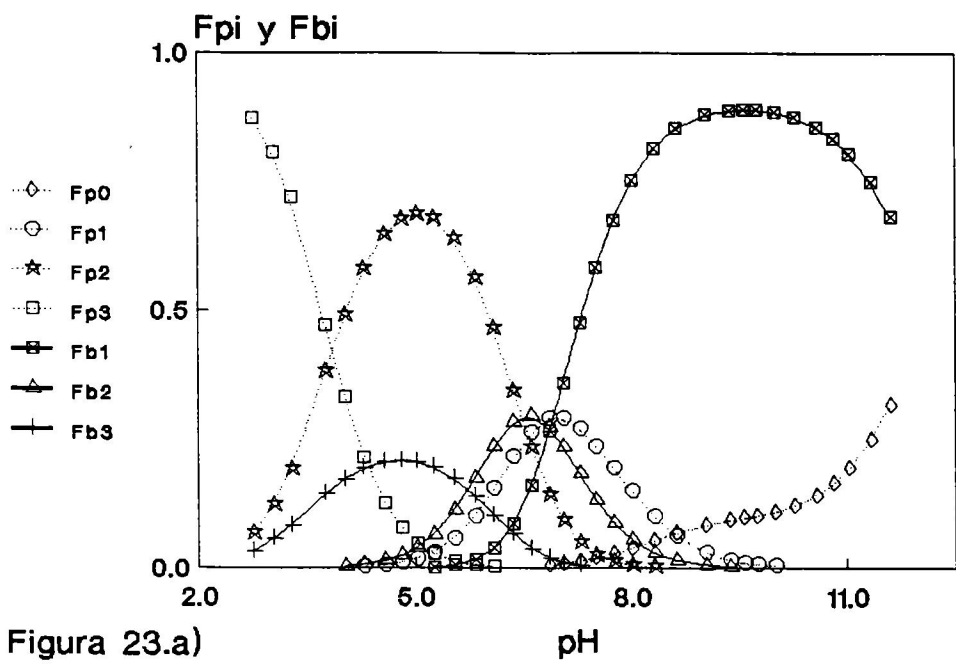


Figura 23.a)

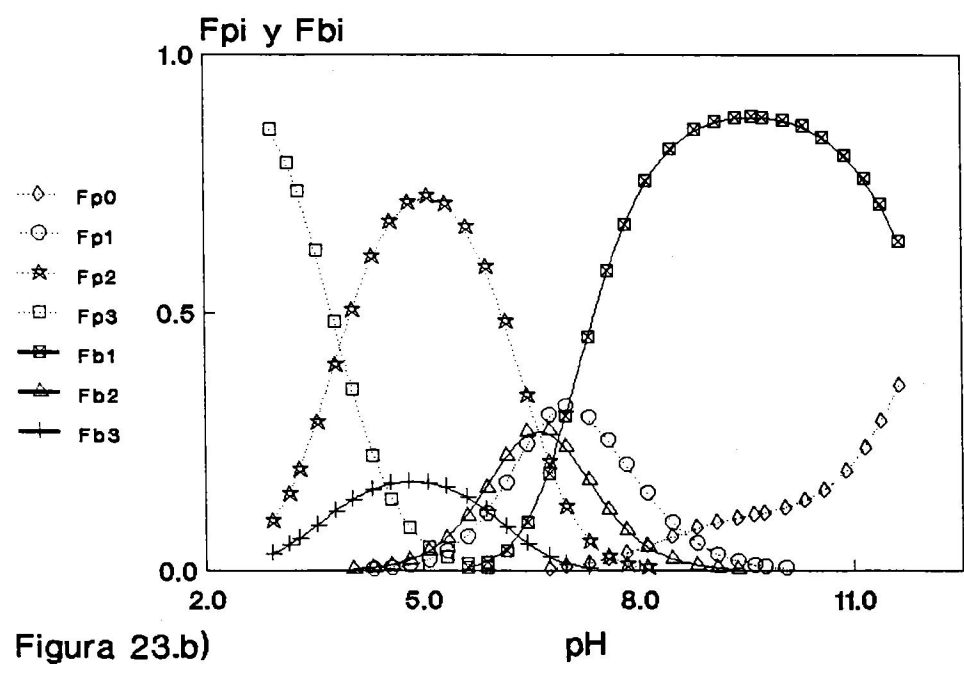


Figura 23.b)

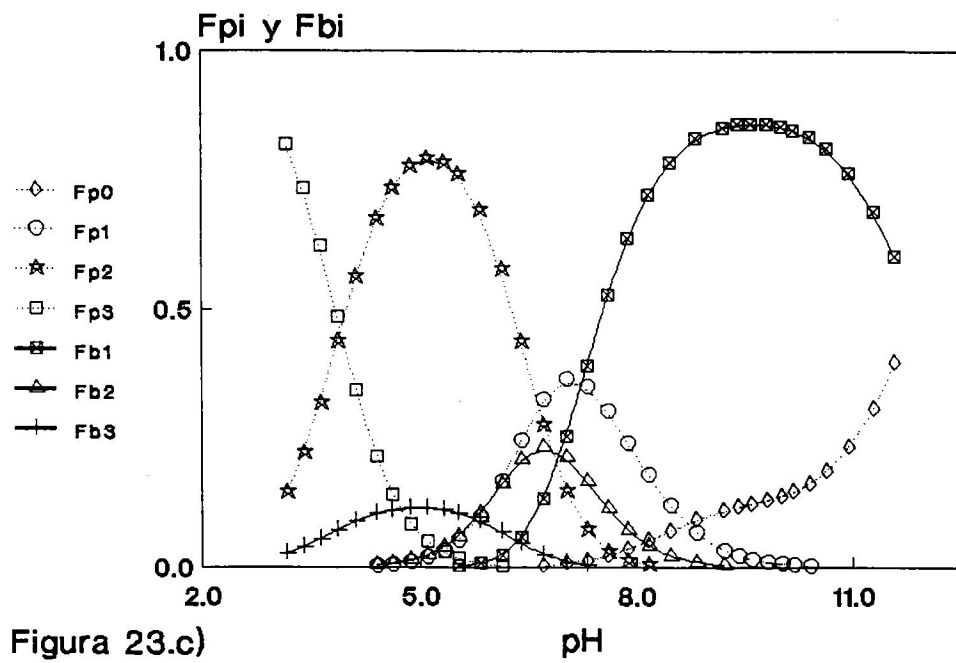


Figura 23.c)

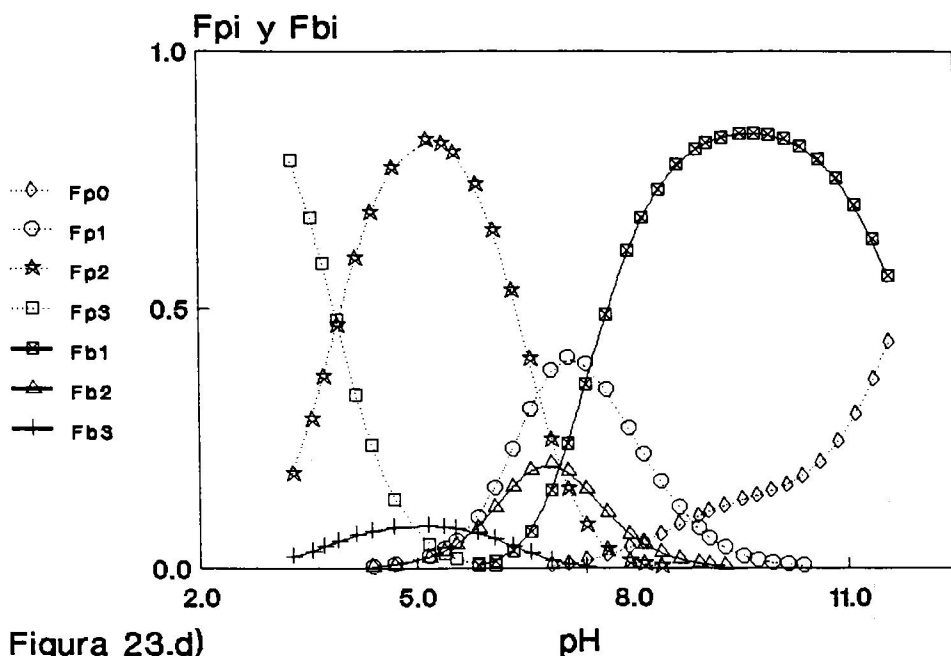


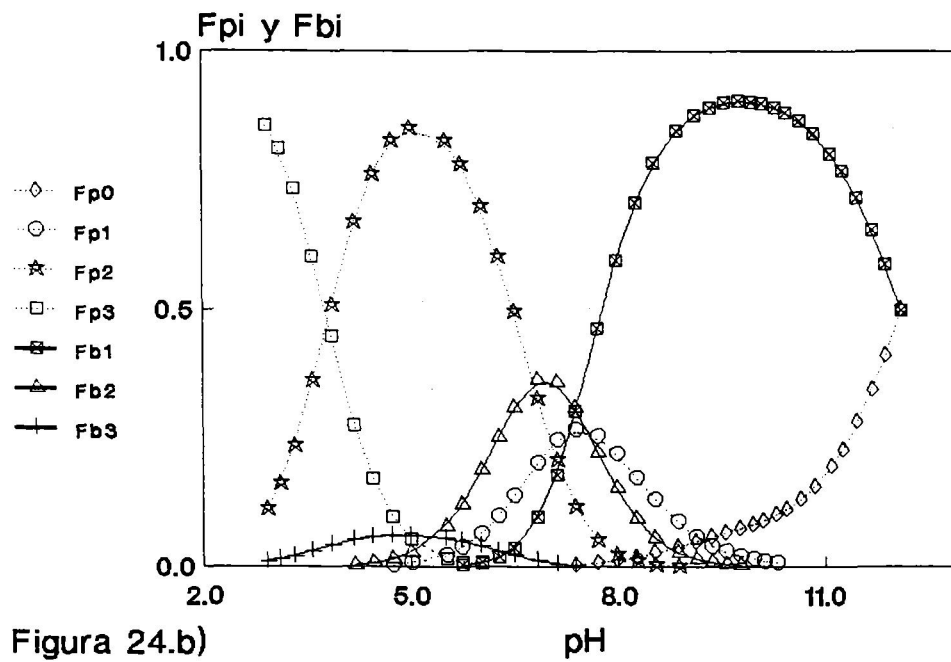
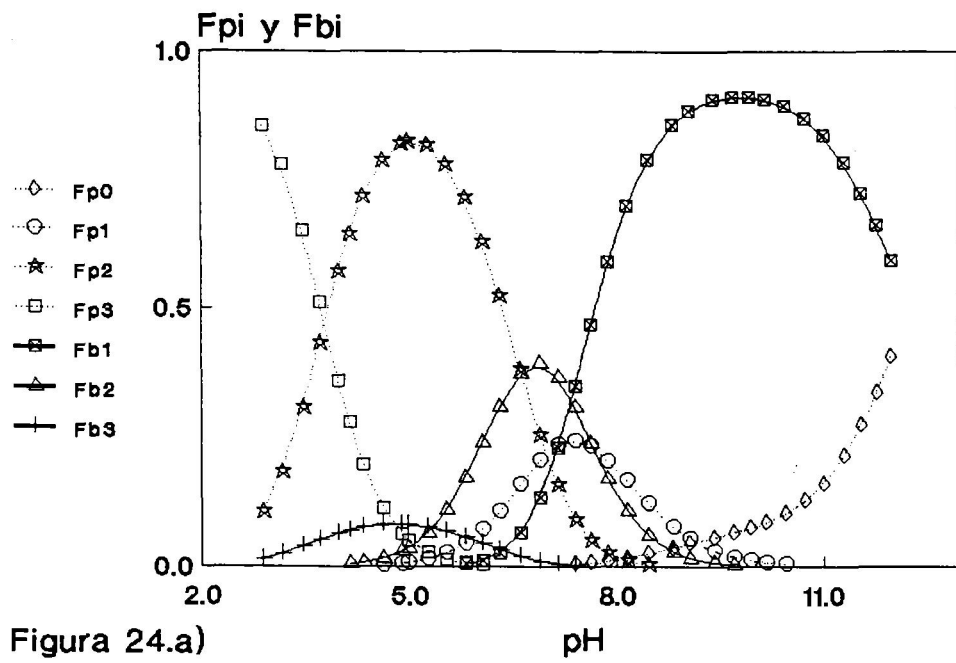
FIGURA 23. Fracciones de las especies iónicas del PLP,  $f_{pi}$ , y de la base de Schiff,  $f_{bi}$ , referidas a la concentración total (suma de las concentraciones de PLP y base de Schiff) frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_H$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

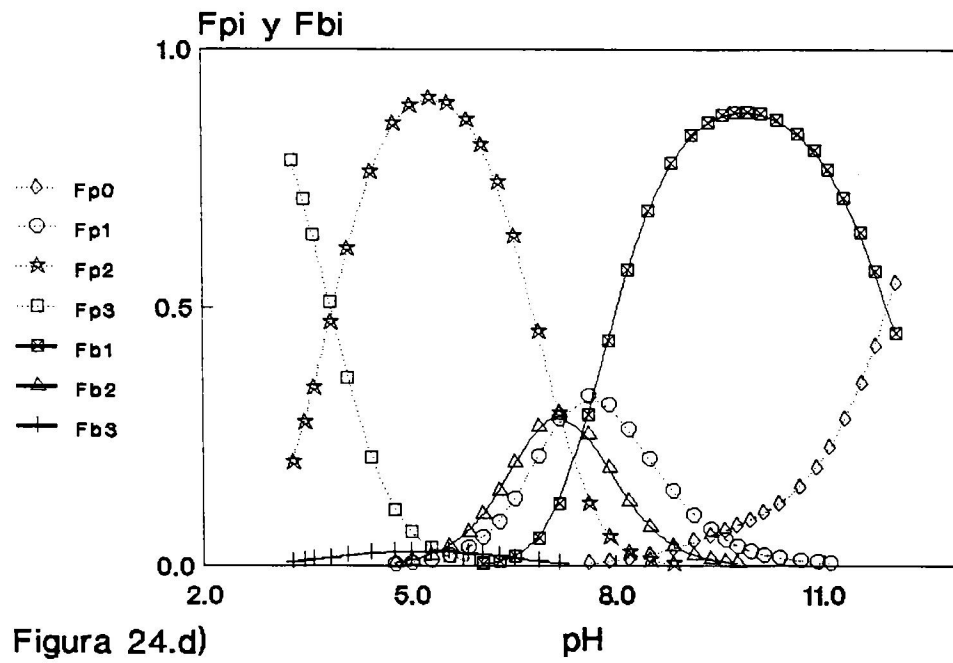
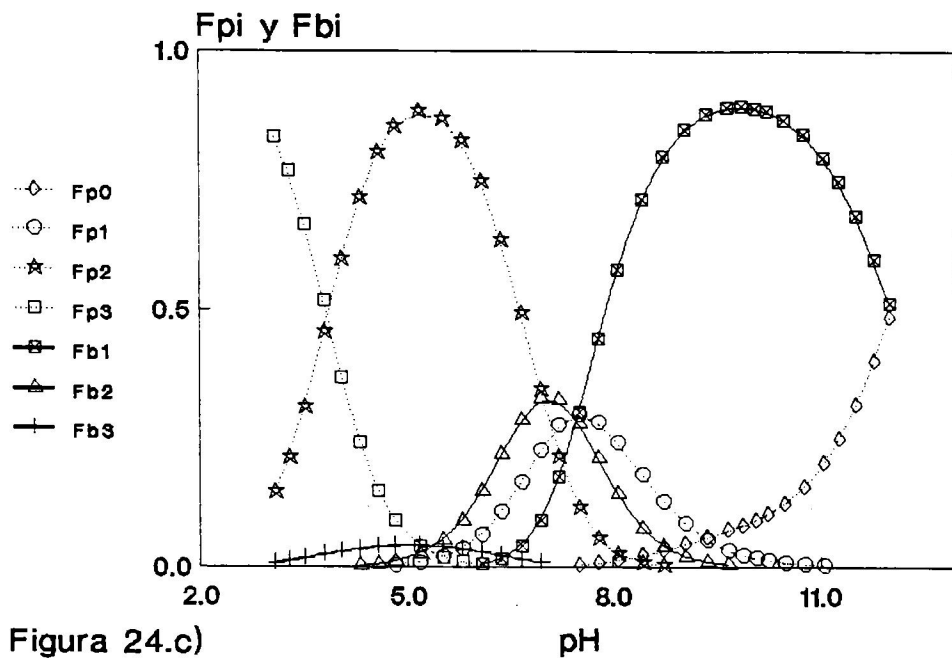
Fig. 23.a =  $3.08 \times 10^{-2}$  M, Fig. 23.b =  $2.05 \times 10^{-2}$  M,

Fig. 23.c =  $9.88 \times 10^{-2}$  M, Fig. 23.d =  $5.93 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.51 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 15 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_4$ , b  $\longrightarrow$   $c_3$ , c  $\longrightarrow$   $c_2$  y d  $\longrightarrow$   $c_1$ .





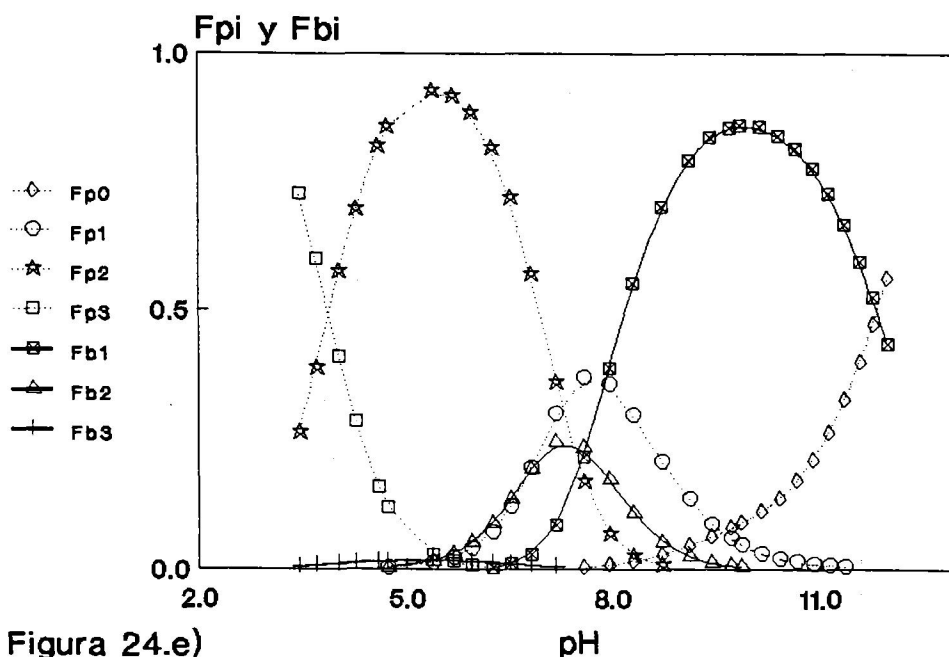


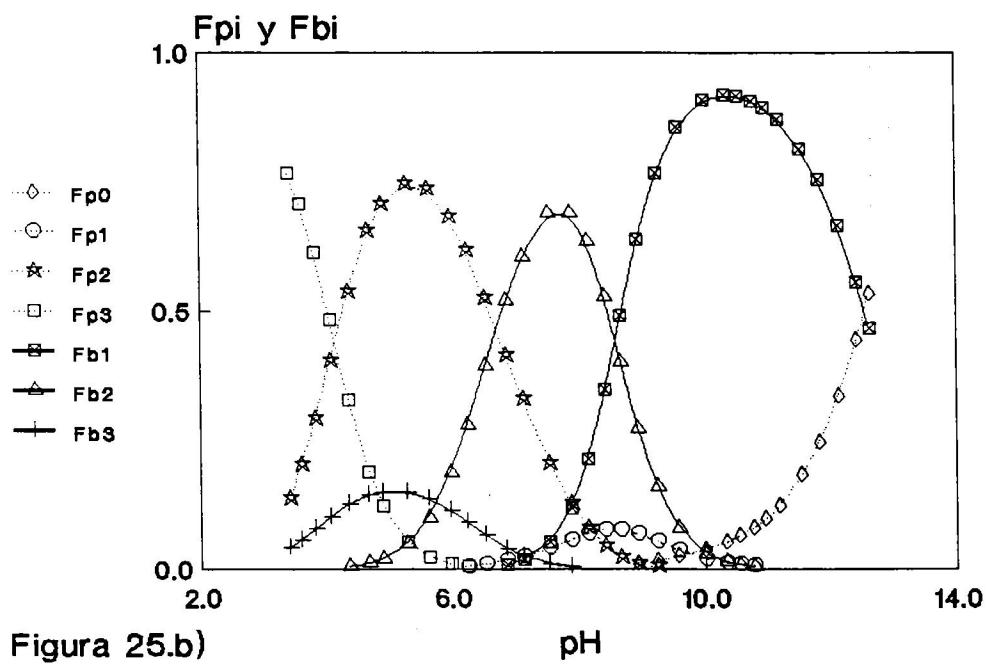
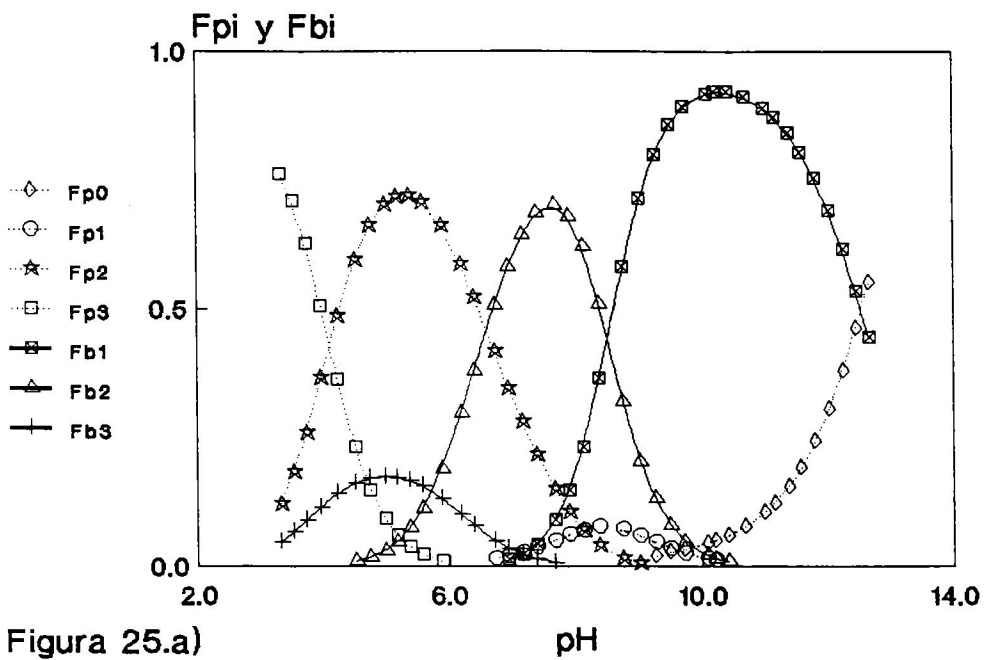
Figura 24.e)

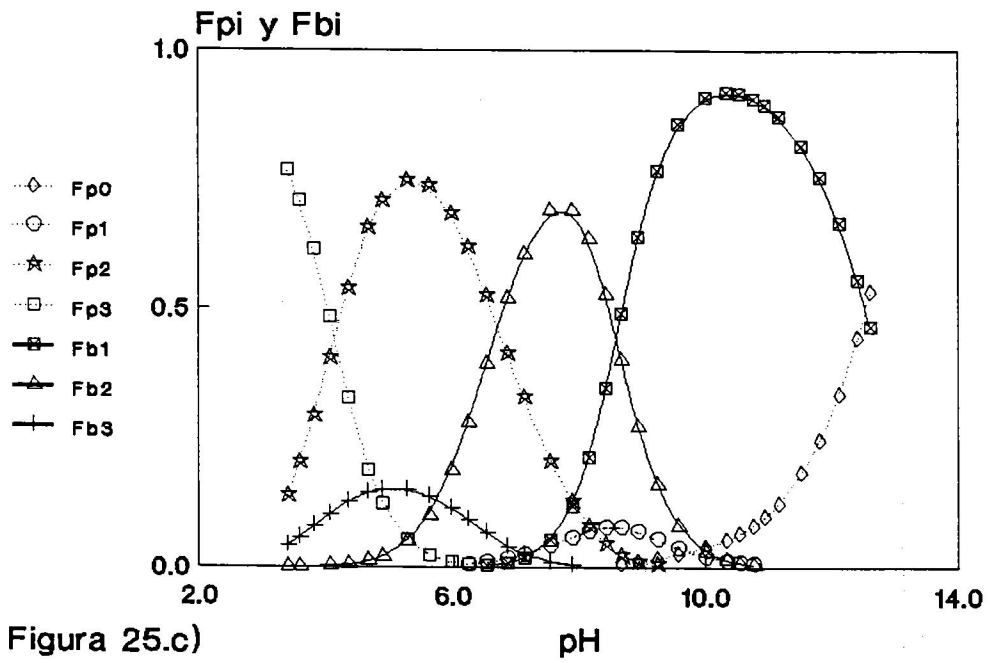
FIGURA 24. Fracciones de las especies iónicas del PLP,  $f_{p_i}$ , y de la base de Schiff,  $f_{b_i}$ , referidas a la concentración total (suma de las concentraciones de PLP y base de Schiff) frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

Fig. 24.a =  $2.14 \times 10^{-2}$  M, Fig. 24.b =  $1.26 \times 10^{-2}$  M,  
 Fig. 24.c =  $6.84 \times 10^{-3}$  M, Fig. 24.d =  $3.86 \times 10^{-3}$  M y  
 Fig. 24.e =  $2.04 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.03 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 16 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_5$ , b  $\longrightarrow$   $c_4$ , c  $\longrightarrow$   $c_3$ , d  $\longrightarrow$   $c_2$  y e  $\longrightarrow$   $c_1$ .







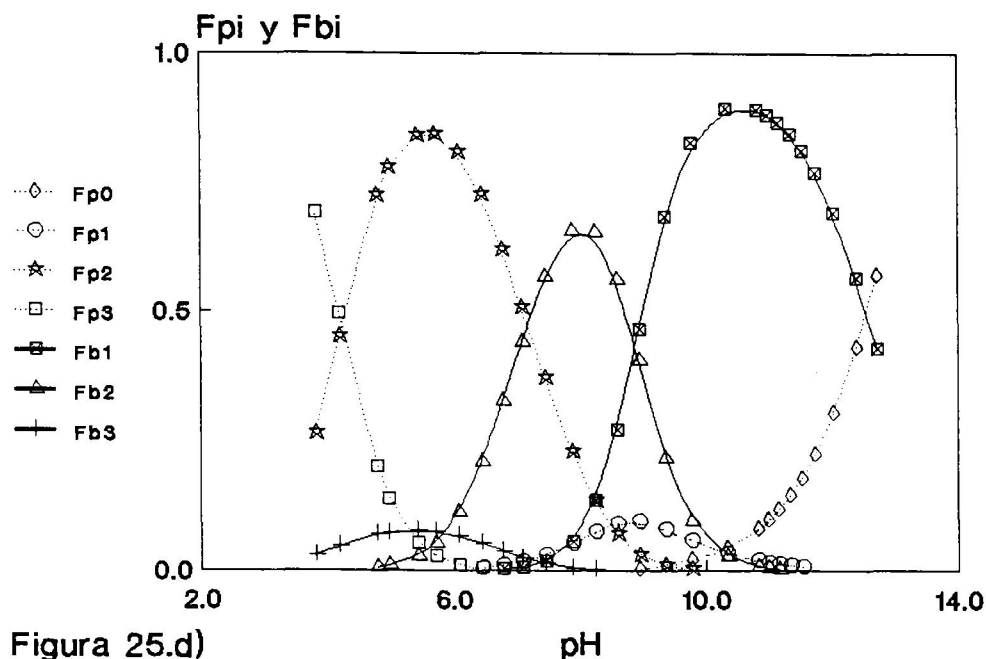


FIGURA 25. Fracciones de las especies iónicas del PLP,  $f_{pi}$ , y de la base de Schiff,  $f_{bi}$ , referidas a la concentración total (suma de las concentraciones de PLP y base de Schiff) frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

Fig. 25.a =  $9.79 \times 10^{-3}$  M, Fig. 25.b =  $6.67 \times 10^{-3}$  M,

Fig. 25.c =  $3.28 \times 10^{-3}$  M, Fig. 25.d =  $1.59 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $5.32 \times 10^{-2}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 17 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_4$ , b  $\longrightarrow$   $c_3$ , c  $\longrightarrow$   $c_2$  y d  $\longrightarrow$   $c_1$ .

las que todas las fracciones de la base de Schiff tienen una proporción apreciable.

En las figuras 26-29 se representan, para cada valoración, las fracciones totales de PLP,  $f_{pt}$ , y base de Schiff,  $f_{bt}$ , en función del pH. Estas fracciones totales se han calculado sumando las fracciones de todas las especies iónicas de PLP o base de Schiff referidas a la concentración total:

$$f_{pt} = f_{p0} + f_{p1} + f_{p2} + f_{p3} \quad (73)$$

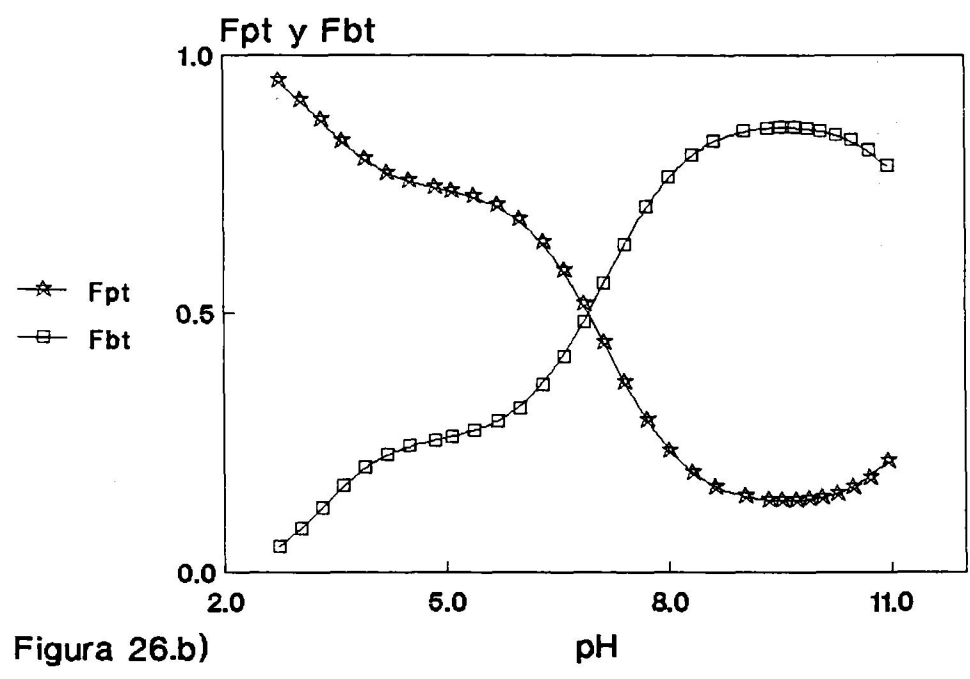
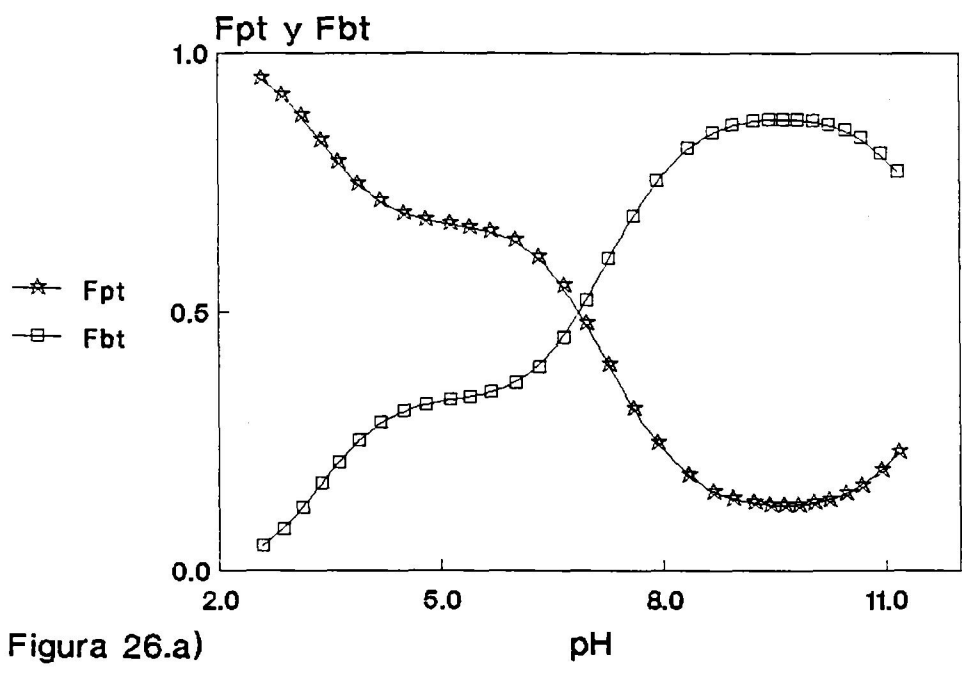
$$f_{bt} = f_{b1} + f_{b2} + f_{b3} \quad (74)$$

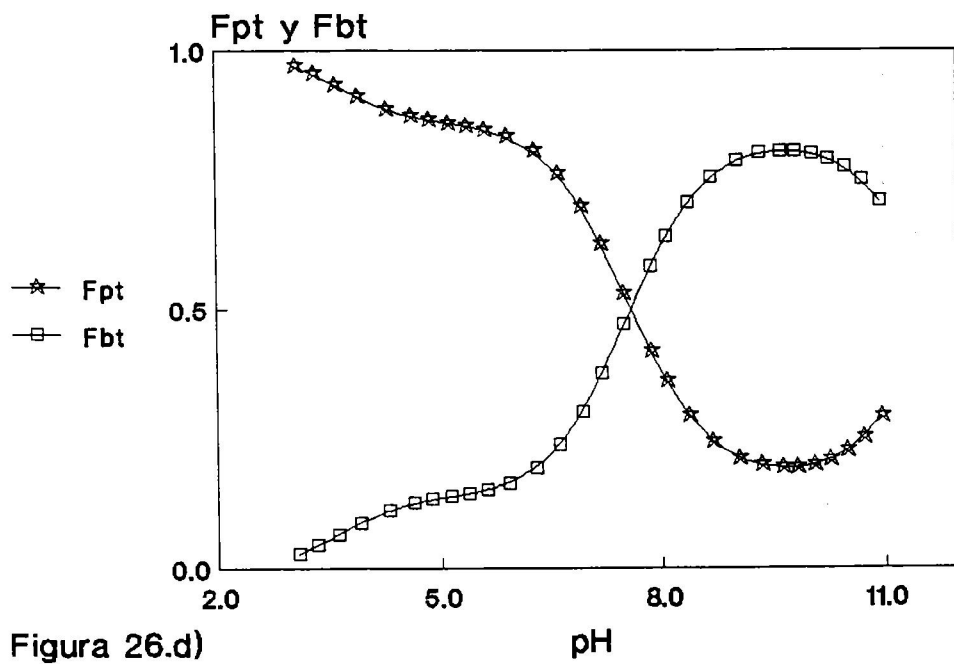
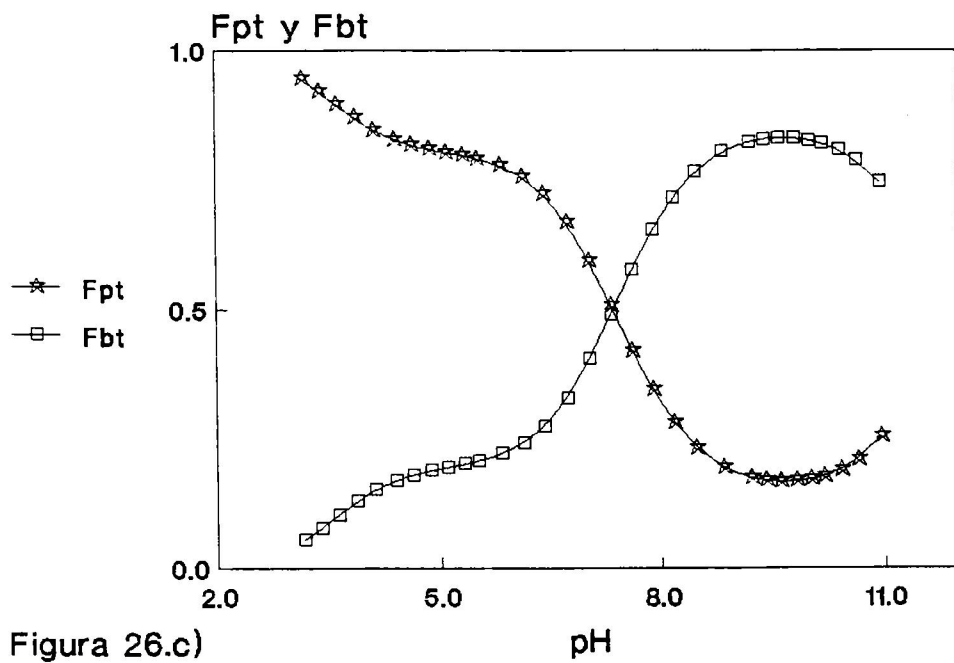
Al igual que en las figuras anteriores observamos que a medida que la concentración inicial es más pequeña la fracción total de PLP aumenta con respecto a la de base de Schiff.

Las fracciones de las especies de la base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , calculadas a partir de los  $pK_{ib}$  obtenidos frente al pH aparecen en las figuras 30-33.

En las figuras 34-37 se representa  $\log K_{pH}$  frente al pH para todas las titulaciones de cada mezcla. Cada una de estas curvas de  $\log K_{pH}$  frente a pH corresponde a una valoración concreta, es decir, cada punto de la curva se ha calculado con los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_H$  obtenidos de los ajustes y con el coeficiente de actividad correspondiente a ese pH (ecuación 52), o sea, la fuerza iónica es distinta para cada punto de la curva. En cada gráfica también hemos incluido la curva de  $\log K_{pH}^0$  para cada mezcla. Este  $\log K_{pH}^0$

se ha calculado con los valores de las constantes termodinámicas correspondientes y considerando la fuerza iónica igual a cero o, lo que es lo mismo, el coeficiente de actividad igual a uno. Esta constante se puede considerar como una constante de equilibrio aparente termodinámica y sólo depende del pH. En la figura 38 representamos  $\log K_{\text{pH}}^0$  para todas las mezclas.





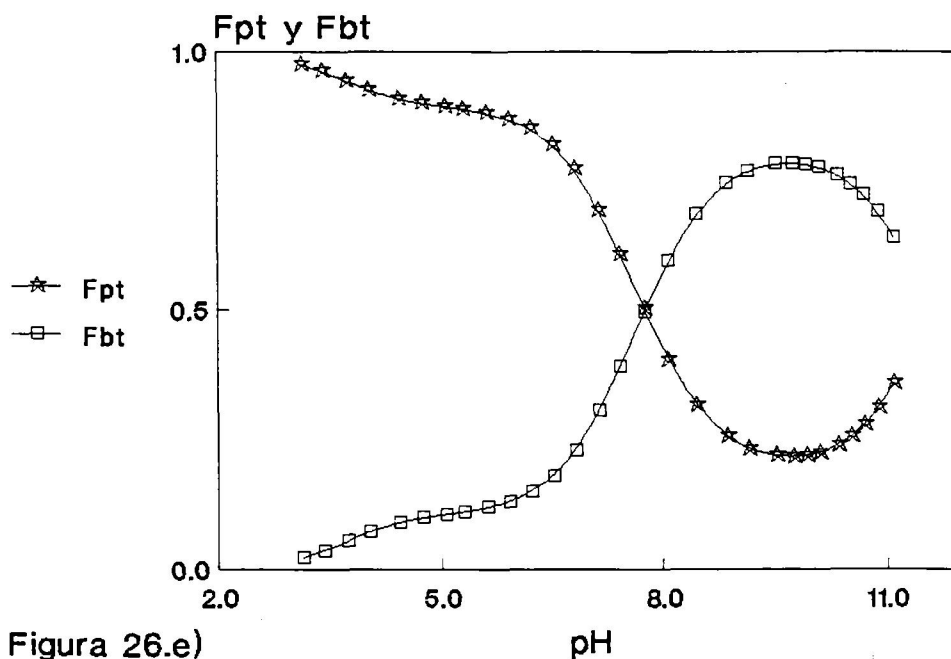
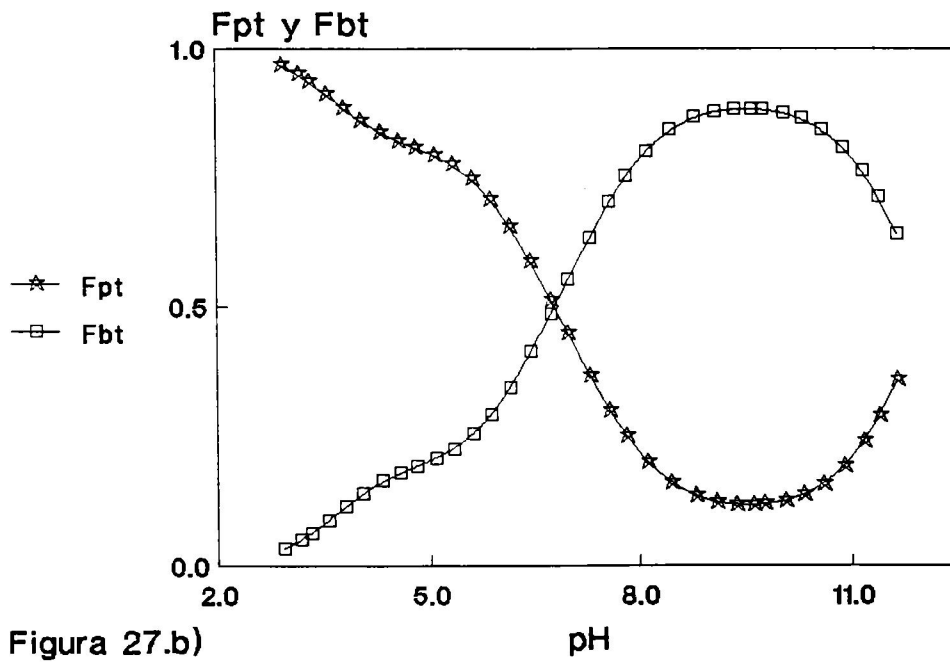
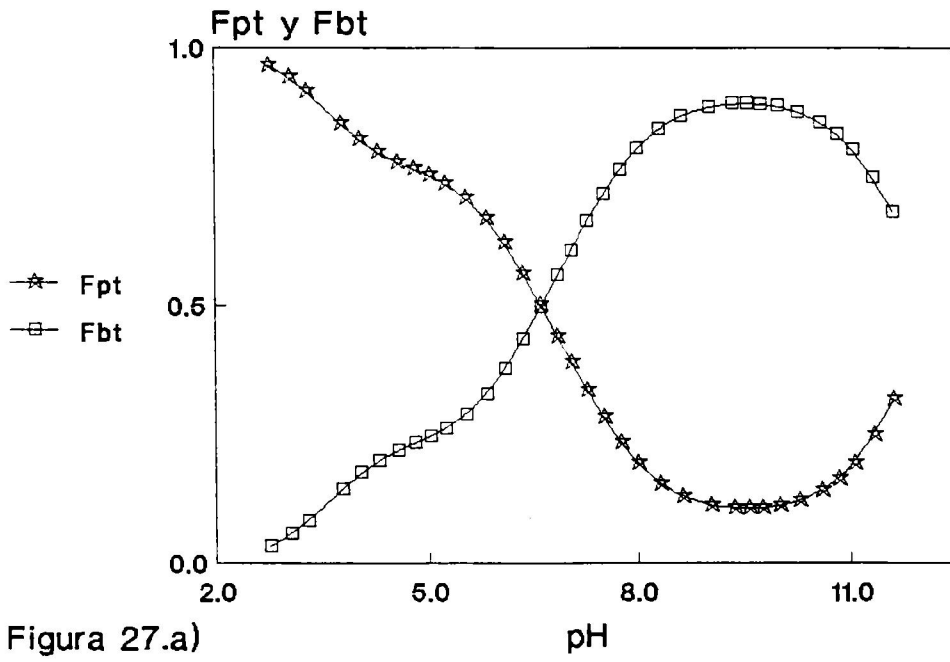


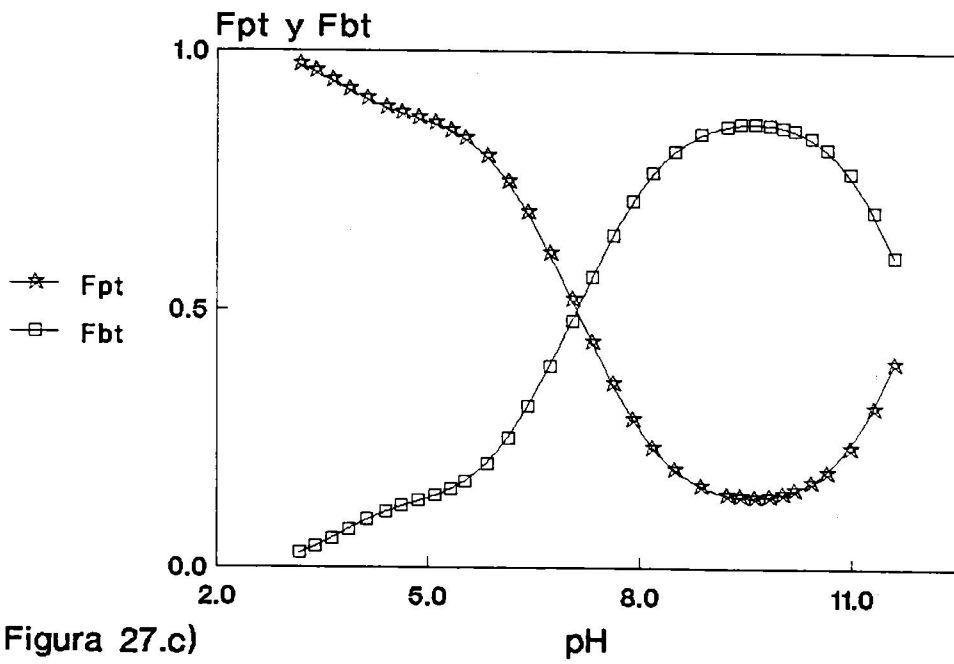
FIGURA 26. Fracciones totales de PLP,  $f_{pt}$  (suma de todas las fracciones de PLP referidas a la concentración total), y base de Schiff,  $f_{bt}$  (suma de todas las fracciones de base de Schiff referidas a la concentración total), frente al pH en agua pura a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_H$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

Fig. 26.a =  $3.01 \times 10^{-2}$  M, Fig. 26.b =  $1.96 \times 10^{-2}$  M,  
 Fig. 26.c =  $9.92 \times 10^{-3}$  M, Fig. 26.d =  $5.72 \times 10^{-3}$  M y  
 Fig. 26.e =  $3.93 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.79 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 14 de la forma siguiente: a  $\rightarrow$   $c_5$ , b  $\rightarrow$   $c_4$ , c  $\rightarrow$   $c_3$ , d  $\rightarrow$   $c_2$  y e  $\rightarrow$   $c_1$ .







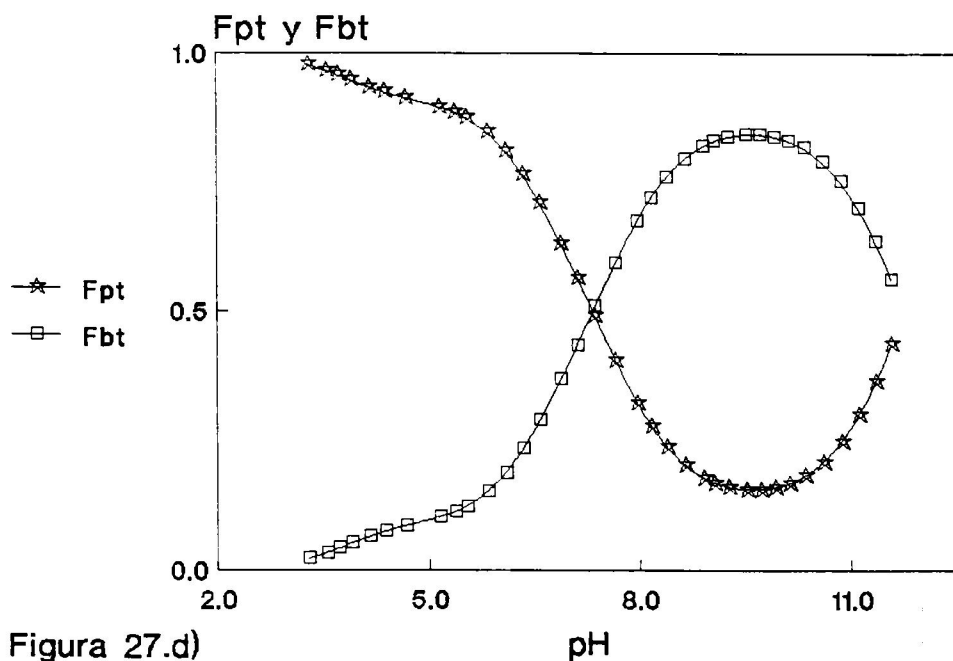


Figura 27.d)

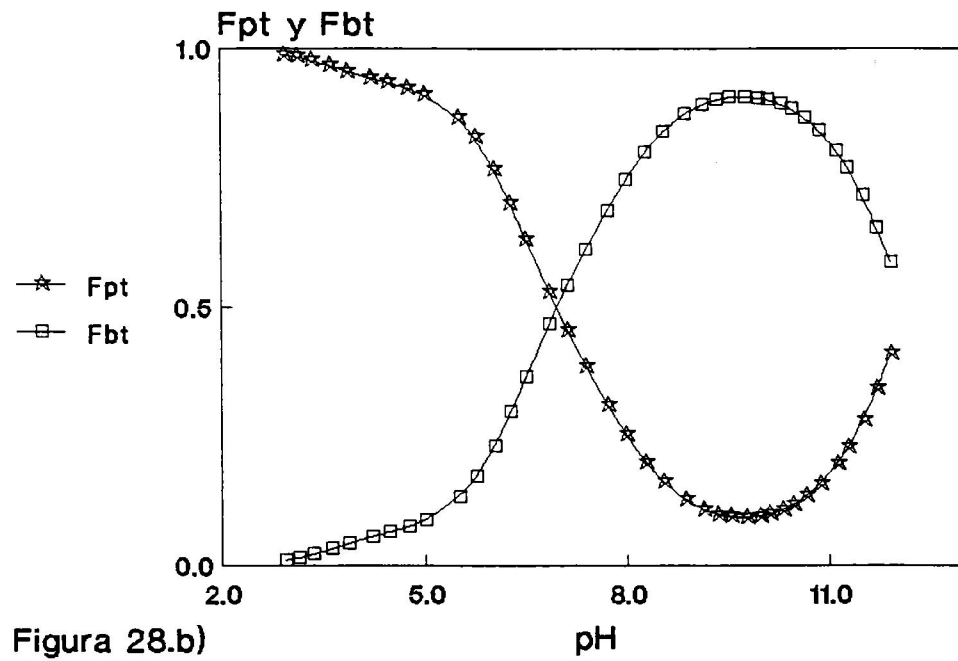
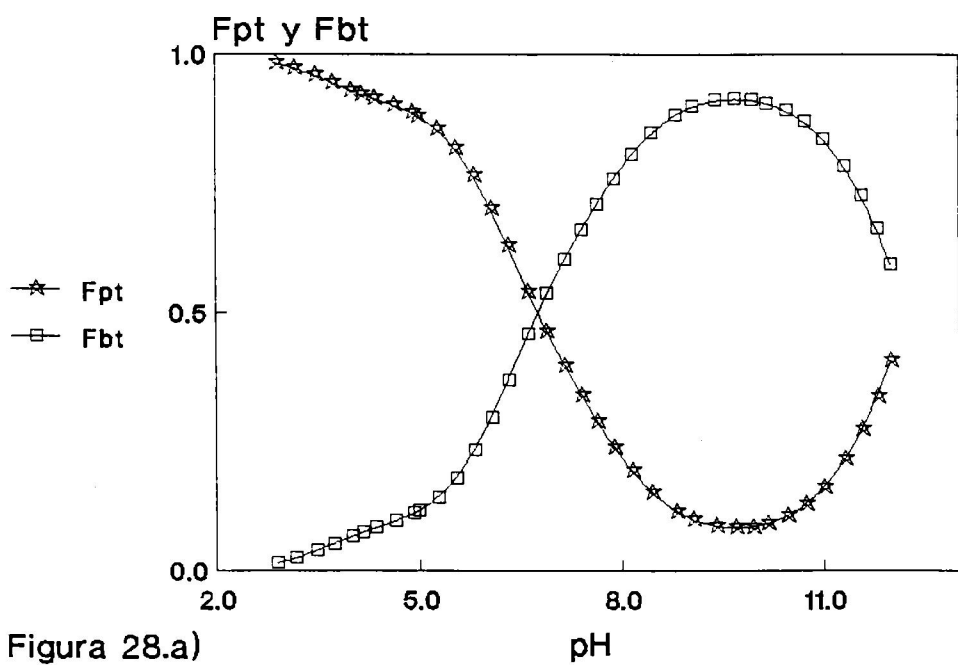
**FIGURA 27.** Fracciones totales de PLP,  $f_{pt}$  (suma de todas las fracciones de PLP referidas a la concentración total), y base de Schiff,  $f_{bt}$  (suma de todas las fracciones de base de Schiff referidas a la concentración total), frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

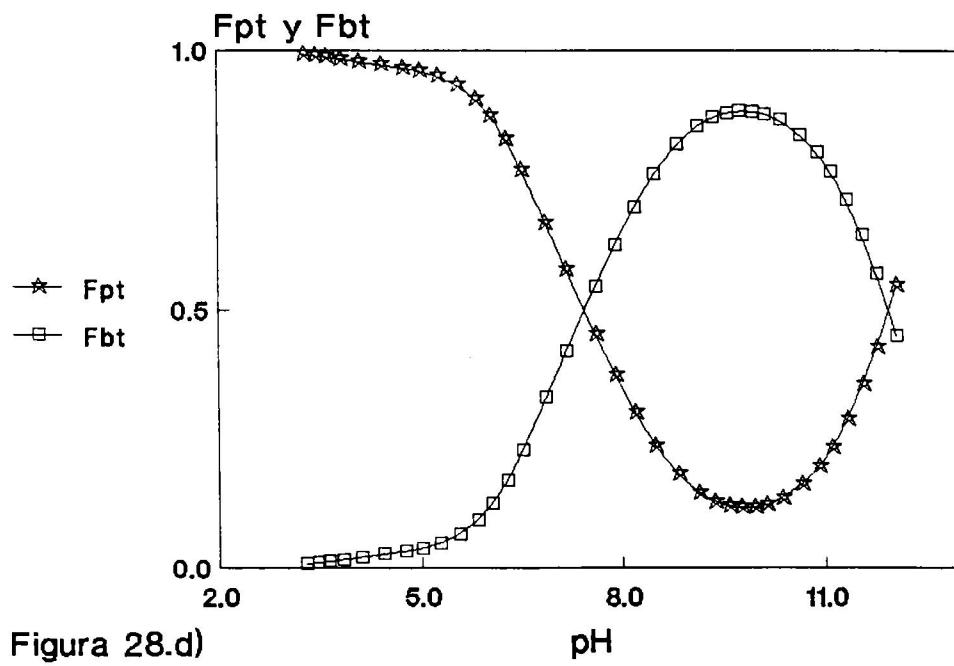
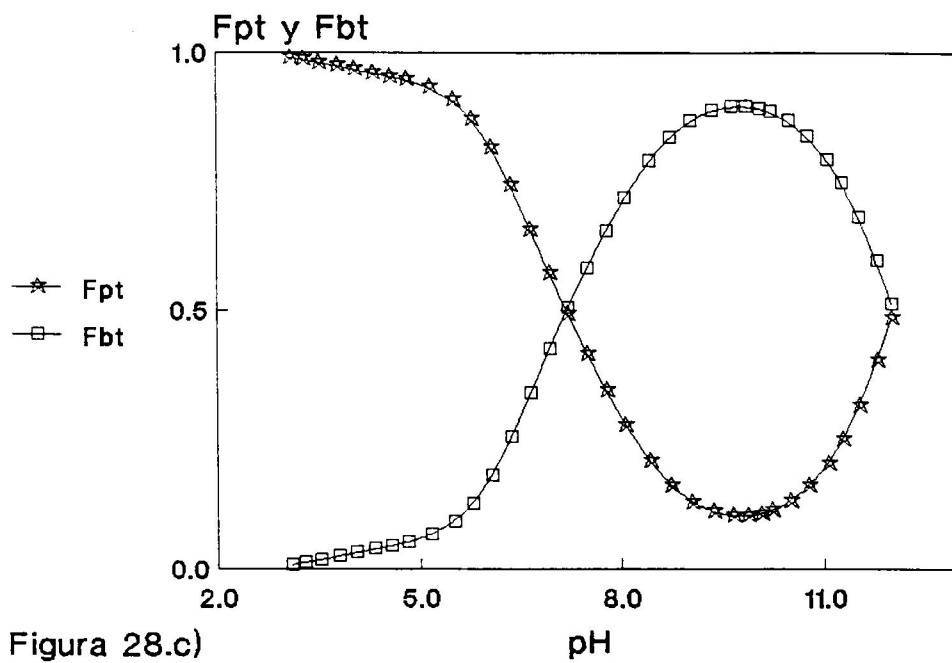
Fig. 27.a =  $3.08 \times 10^{-2}$  M, Fig. 27.b =  $2.05 \times 10^{-2}$  M,

Fig. 27.c =  $9.88 \times 10^{-3}$  M y Fig. 27.d =  $5.93 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.51 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 15 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_4$ , b  $\longrightarrow$   $c_3$ , c  $\longrightarrow$   $c_2$  y d  $\longrightarrow$   $c_1$ .





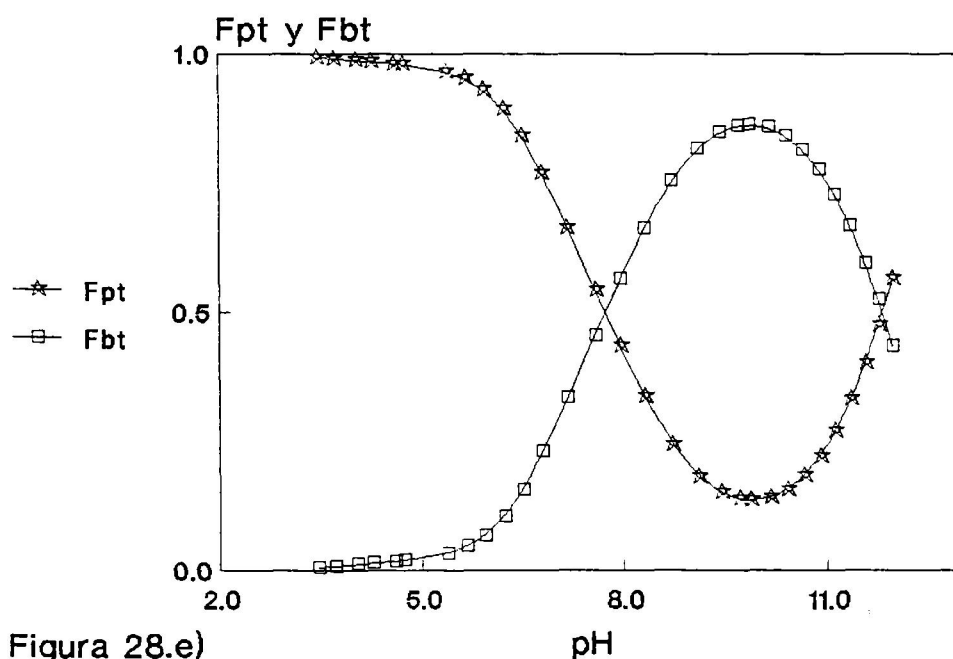


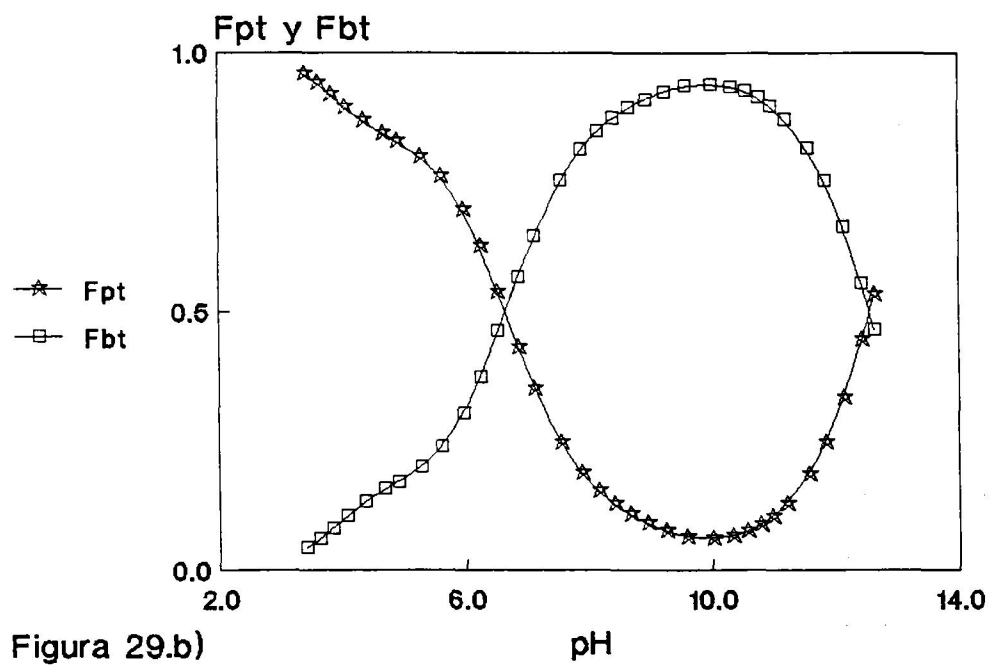
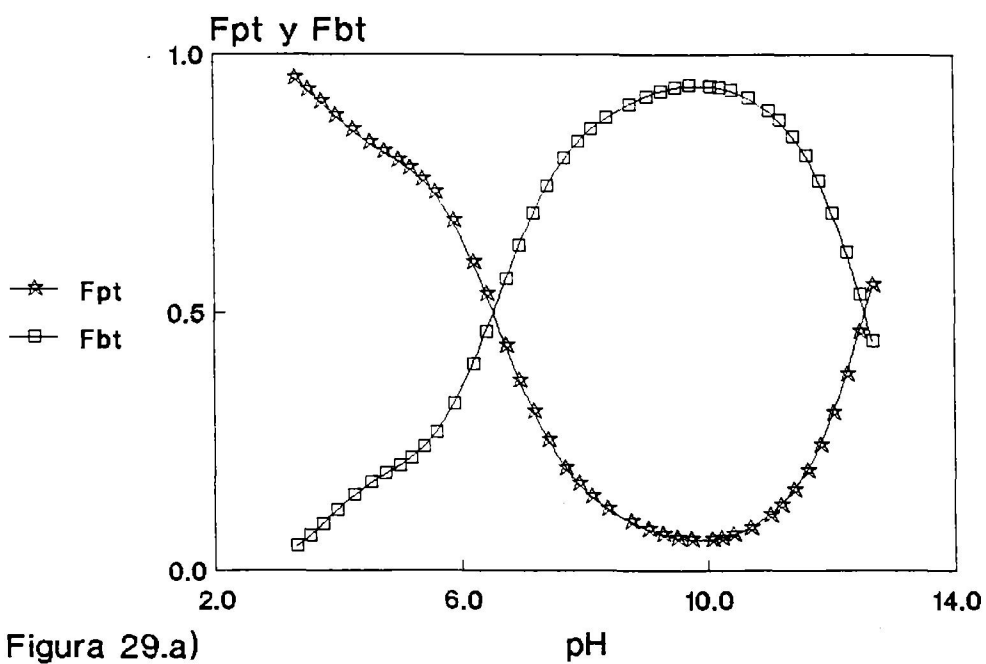
Figura 28.e)

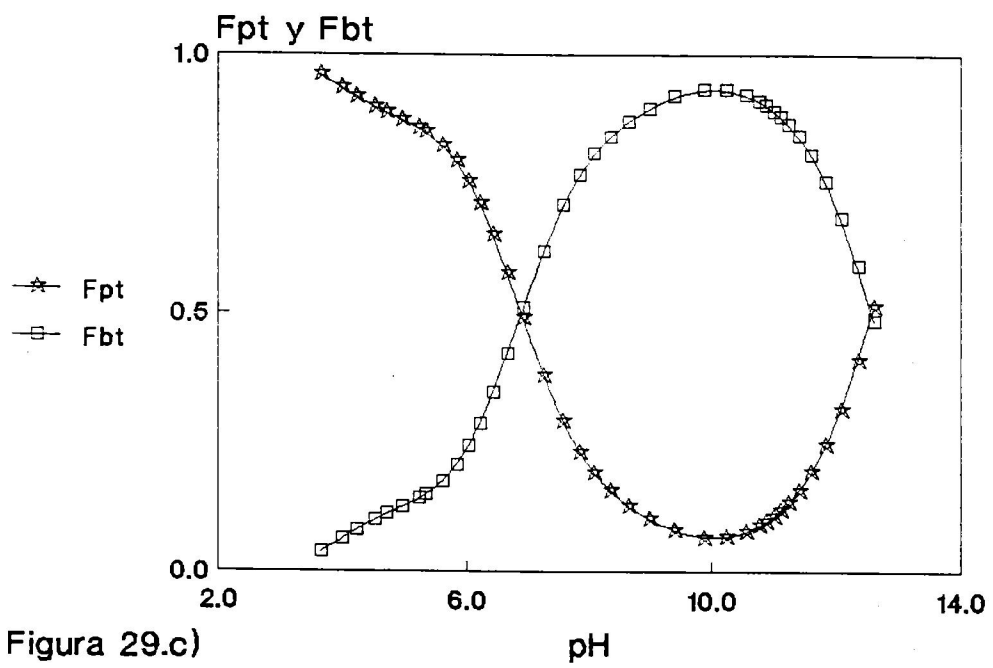
FIGURA 28. Fracciones totales de PLP,  $f_{pt}$  (suma de todas las fracciones de PLP referidas a la concentración total), y base de Schiff,  $f_{bt}$  (suma de todas las fracciones de base de Schiff referidas a la concentración total), frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

Fig. 28.a =  $2.14 \times 10^{-2}$  M, Fig. 28.b =  $1.26 \times 10^{-2}$  M,  
 Fig. 28.c =  $6.84 \times 10^{-3}$  M, Fig. 28.d =  $3.86 \times 10^{-3}$  M y  
 Fig. 28.e =  $2.04 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.03 \times 10^{-1}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 16 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_5$ , b  $\longrightarrow$   $c_4$ , c  $\longrightarrow$   $c_3$ , d  $\longrightarrow$   $c_2$  y e  $\longrightarrow$   $c_1$ .





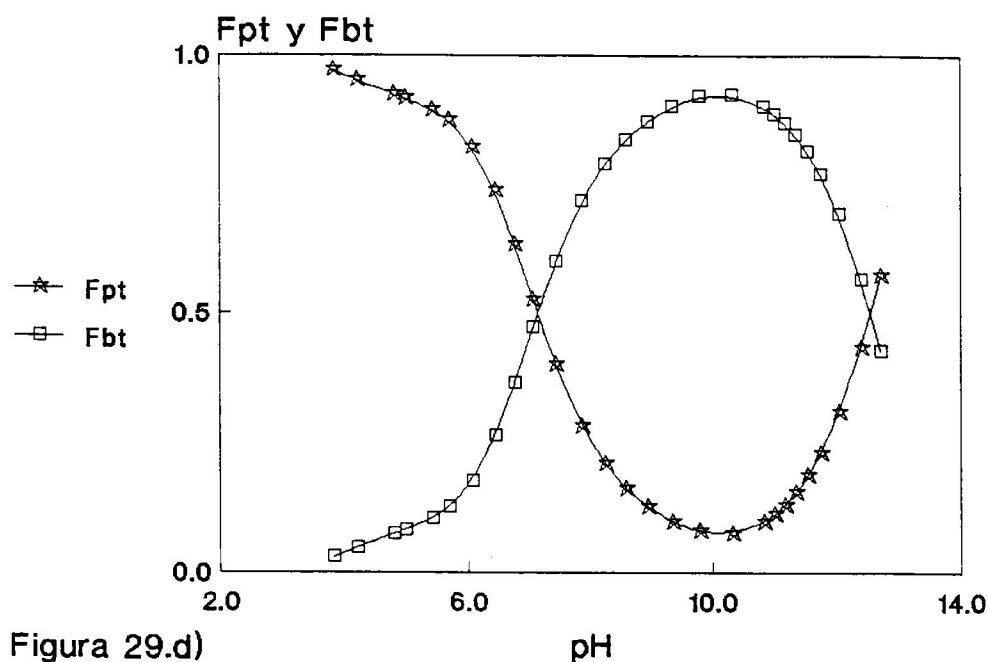


FIGURA 29. Fracciones totales de PLP,  $f_{pt}$  (suma de todas las fracciones de PLP referidas a la concentración total), y base de Schiff,  $f_{bt}$  (suma de todas las fracciones de base de Schiff referidas a la concentración total), frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado a partir de los  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tabla 2). Las concentraciones iniciales de PLP y amina son:

Fig. 29.a =  $9.79 \times 10^{-3}$  M, Fig. 29.b =  $6.67 \times 10^{-3}$  M,

Fig. 29.c =  $3.28 \times 10^{-3}$  M, Fig. 29.d =  $1.59 \times 10^{-3}$  M.

La concentración de la disolución valorante de KOH es  $5.32 \times 10^{-2}$  M en todos los casos.

La variación de las fracciones que aparece en cada una de las figuras corresponde a las valoraciones de la figura 17 de la forma siguiente: a  $\longrightarrow$   $c_4$ , b  $\longrightarrow$   $c_3$ , c  $\longrightarrow$   $c_2$  y d  $\longrightarrow$   $c_1$ .

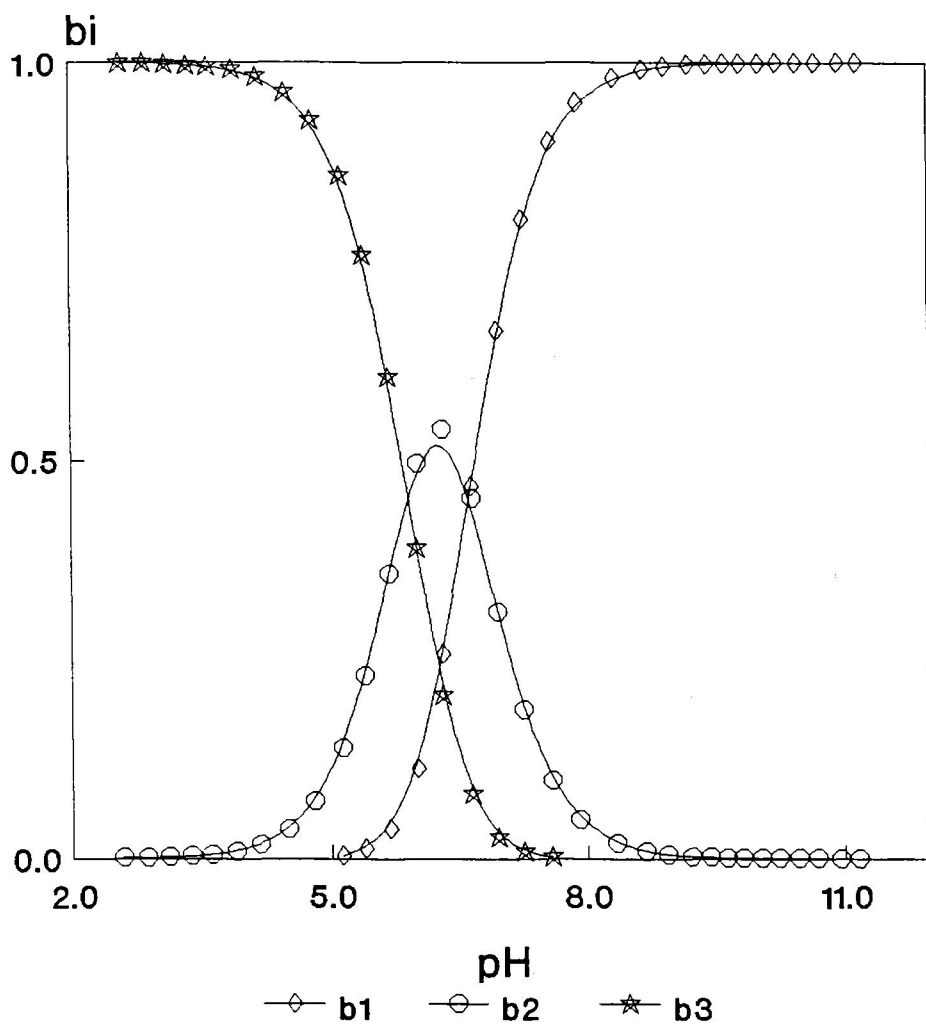


FIGURA 30. Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en agua pura a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de base de Schiff con los  $pK_{1b}$  termodinámicos obtenidos de los ajustes (tabla 2) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 41, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.



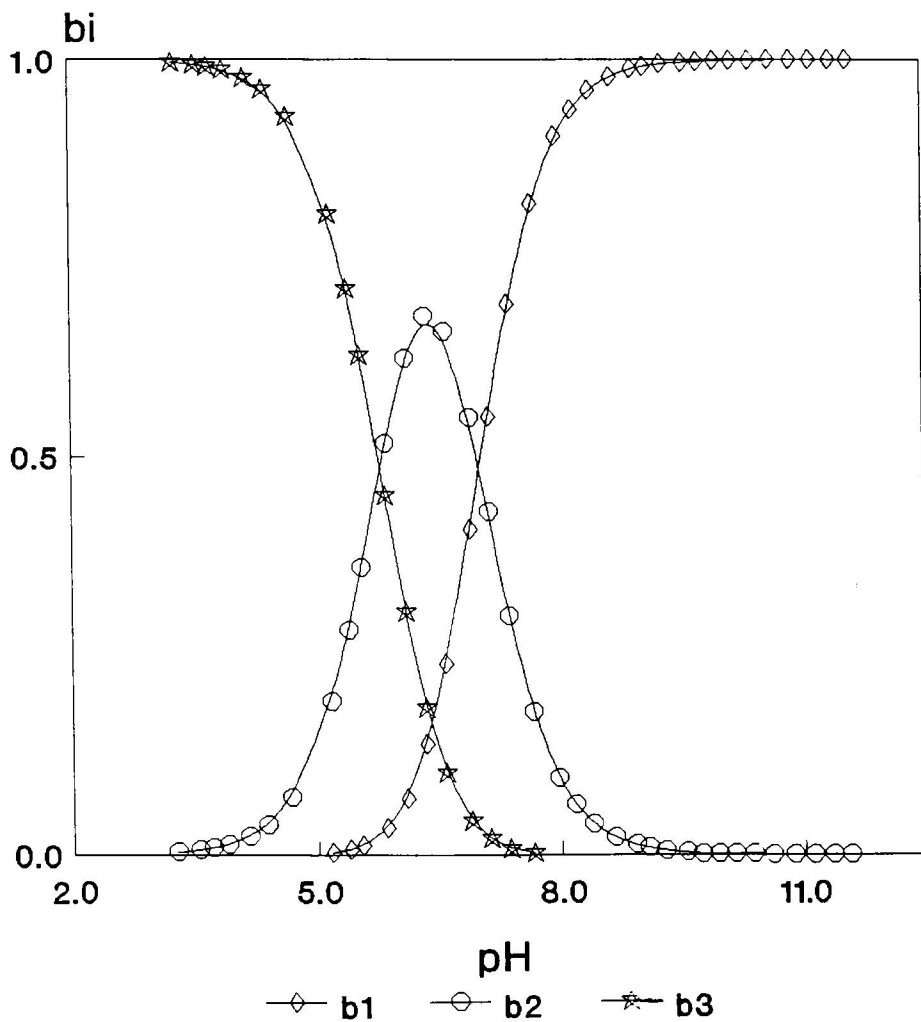
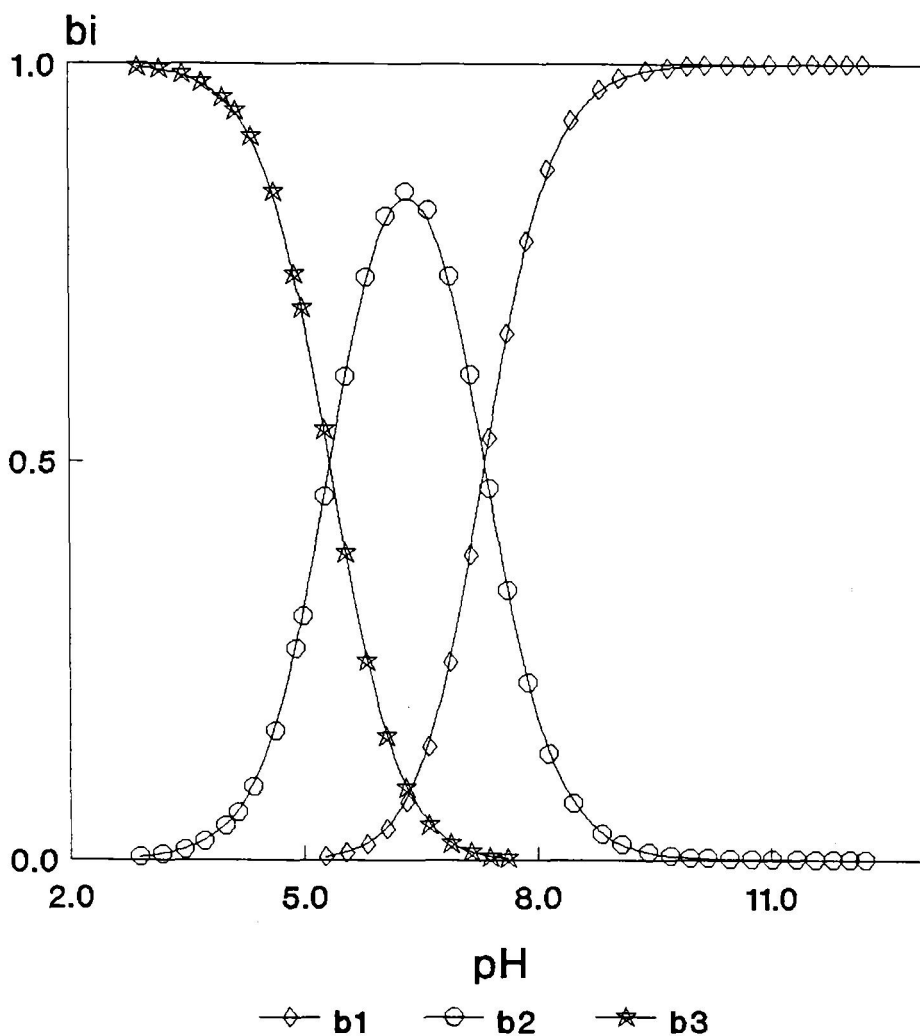


FIGURA 31. Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de base de Schiff con los  $pK_{1b}$  termodinámicos obtenidos de los ajustes (tabla 2) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 41, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.



**FIGURA 32.** Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de base de Schiff con los  $pK_{1b}$  termodinámicos obtenidos de los ajustes (tabla 2) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 41, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

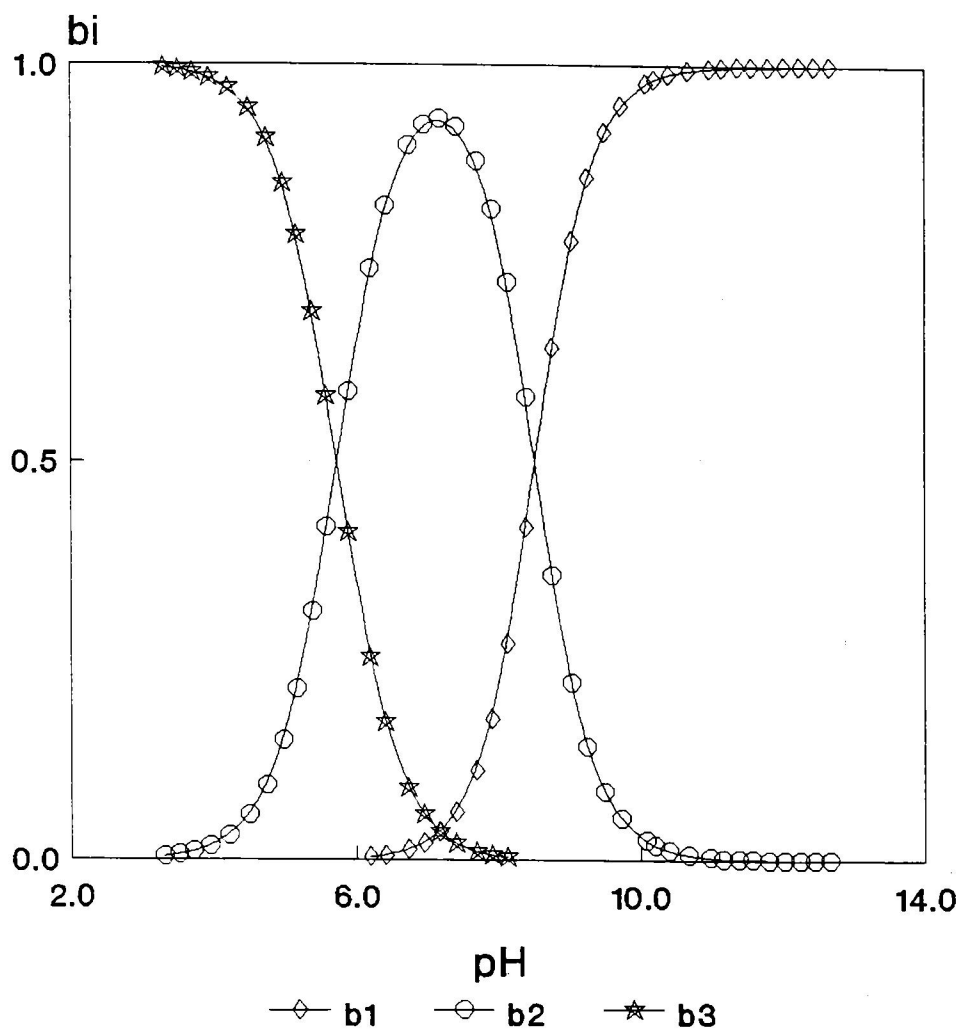


FIGURA 33. Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de base de Schiff con los  $pK_{1b}$  termodinámicos obtenidos de los ajustes (tabla 2) y  $\gamma_{\pm} = 1$  utilizando la ecuación 41, por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

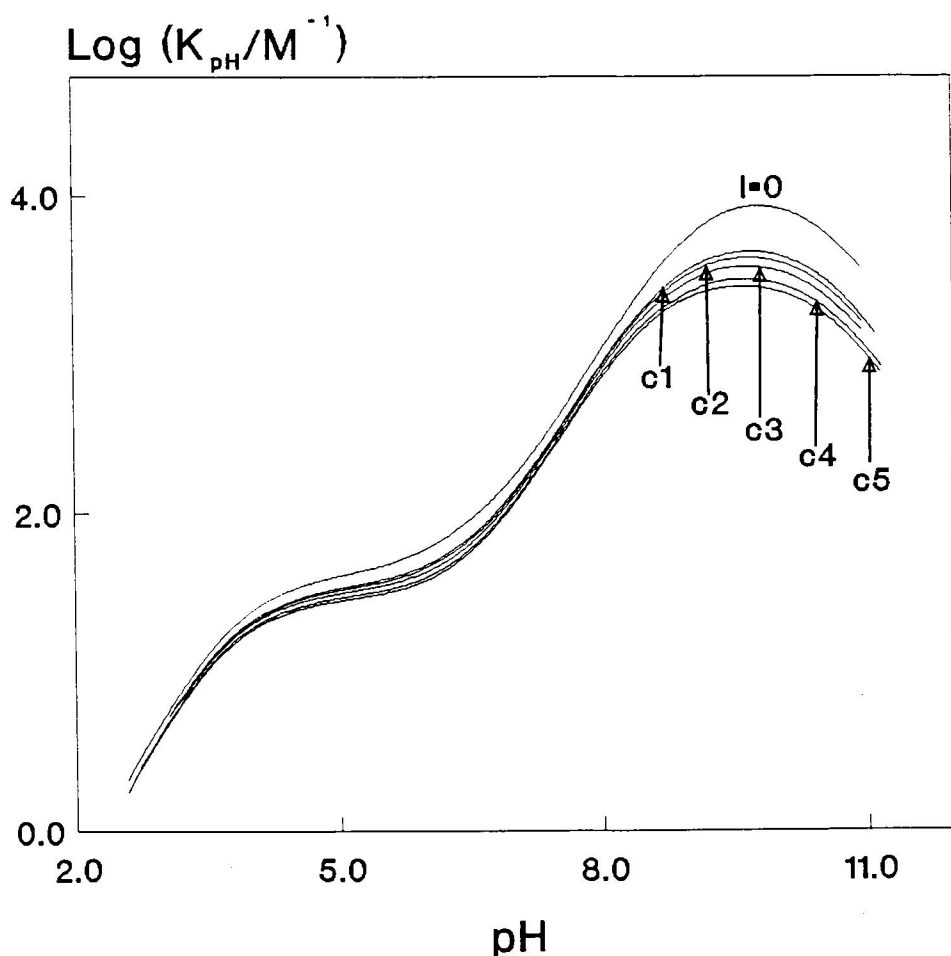


FIGURA 34.  $\text{Log } K_{\text{pH}}$  frente pH en agua pura a  $25^\circ\text{C}$  a diferente fuerza iónica. Cada curva se ha calculado a partir de los datos experimentales de una valoración concreta con los  $\text{p}K_{\text{ip}}$ ,  $\text{p}K_{\text{ib}}$  y  $\text{p}K_{\text{M}}$  obtenidos de los ajustes (tabla 2) utilizando el  $\gamma_{\pm}$  correspondiente a cada pH (ecuación 52). Las concentraciones iniciales de PLP y n-hexilamina son:  $c_1 = 3.93 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_2 = 5.72 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_3 = 9.92 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_4 = 1.96 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $c_5 = 3.01 \times 10^{-2} \text{ M}$ . La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.79 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos; las valoraciones son las que se muestran en la figura 14. La curva superior se ha calculado igual que las anteriores pero considerando  $\gamma_{\pm} = 1$ , es decir, se trata del  $\text{log } K_{\text{pH}}$  que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero.

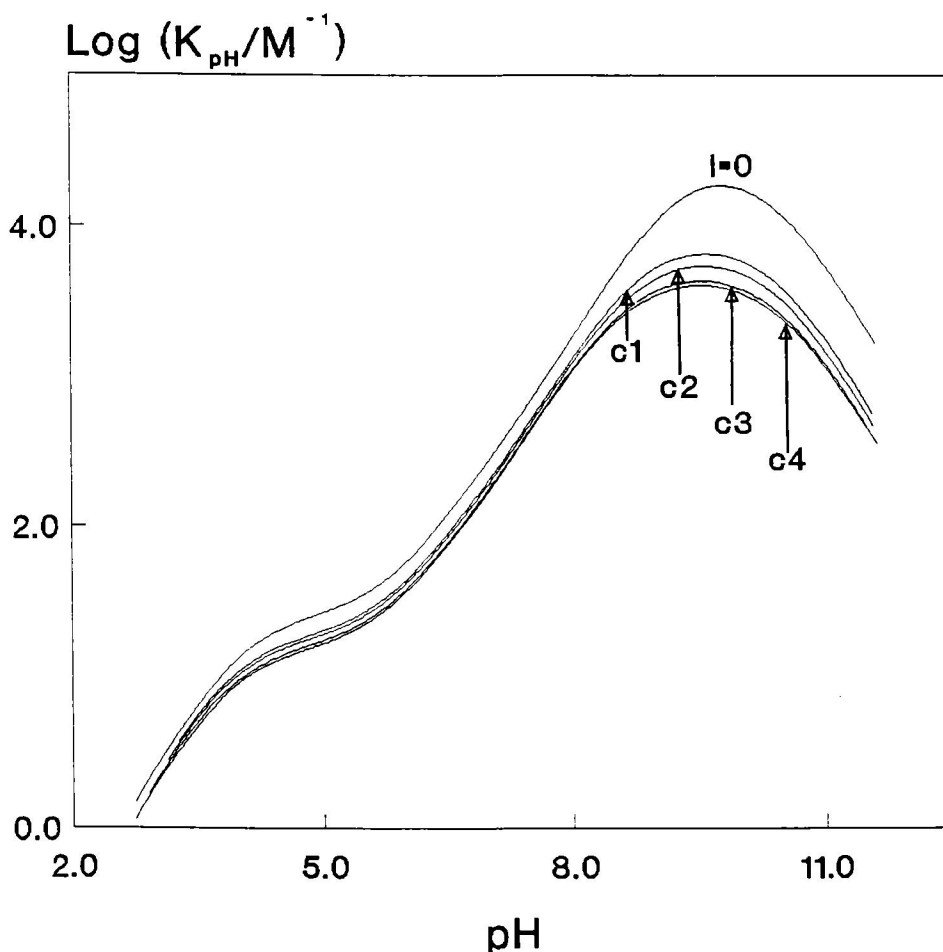


FIGURA 35.  $\text{Log } K_{\text{pH}}$  frente  $\text{pH}$  en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a  $25^\circ \text{C}$  a diferente fuerza iónica. Cada curva se ha calculado a partir de los datos experimentales de una valoración concreta con los  $\text{p}K_{\text{ip}}$ ,  $\text{p}K_{\text{ib}}$  y  $\text{p}K_{\text{M}}$  obtenidos de los ajustes (tabla 2) utilizando el  $\gamma_{\pm}$  correspondiente a cada  $\text{pH}$  (ecuación 52). Las concentraciones iniciales de PLP y n-hexilamina son:  $c_1 = 5.93 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_2 = 9.88 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_3 = 2.05 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $c_4 = 3.08 \times 10^{-2} \text{ M}$ . La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.51 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos; las valoraciones son las que se muestran en la figura 15. La curva superior se ha calculado igual que las anteriores pero considerando  $\gamma_{\pm} = 1$ , es decir, se trata del  $\text{log } K_{\text{pH}}$  que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero.

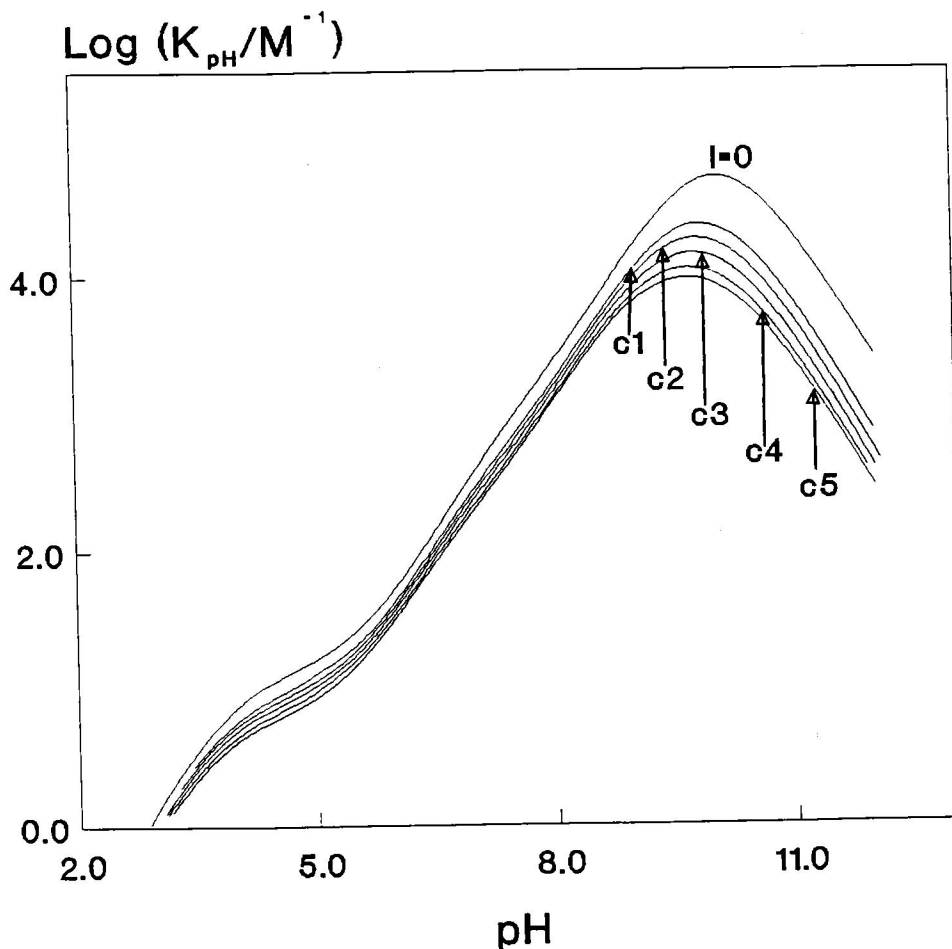


FIGURA 36.  $\text{Log } K_{\text{pH}}$  frente pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C a diferente fuerza iónica. Cada curva se ha calculado a partir de los datos experimentales de una valoración concreta con los  $\text{p}K_{\text{ip}}$ ,  $\text{p}K_{\text{ib}}$  y  $\text{p}K_{\text{H}}$  obtenidos de los ajustes (tabla 2) utilizando el  $\gamma_{\pm}$  correspondiente a cada pH (ecuación 52). Las concentraciones iniciales de PLP y n-hexilamina son:  $c_1 = 2.04 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_2 = 3.86 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_3 = 6.84 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_4 = 1.26 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $c_5 = 2.14 \times 10^{-2} \text{ M}$ . La concentración de la disolución valorante de KOH es  $1.03 \times 10^{-1} \text{ M}$  en todos los casos; las valoraciones son las que se muestran en la figura 16. La curva superior se ha calculado igual que las anteriores pero considerando  $\gamma_{\pm} = 1$ , es decir, se trata del  $\text{log } K_{\text{pH}}$  que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero.

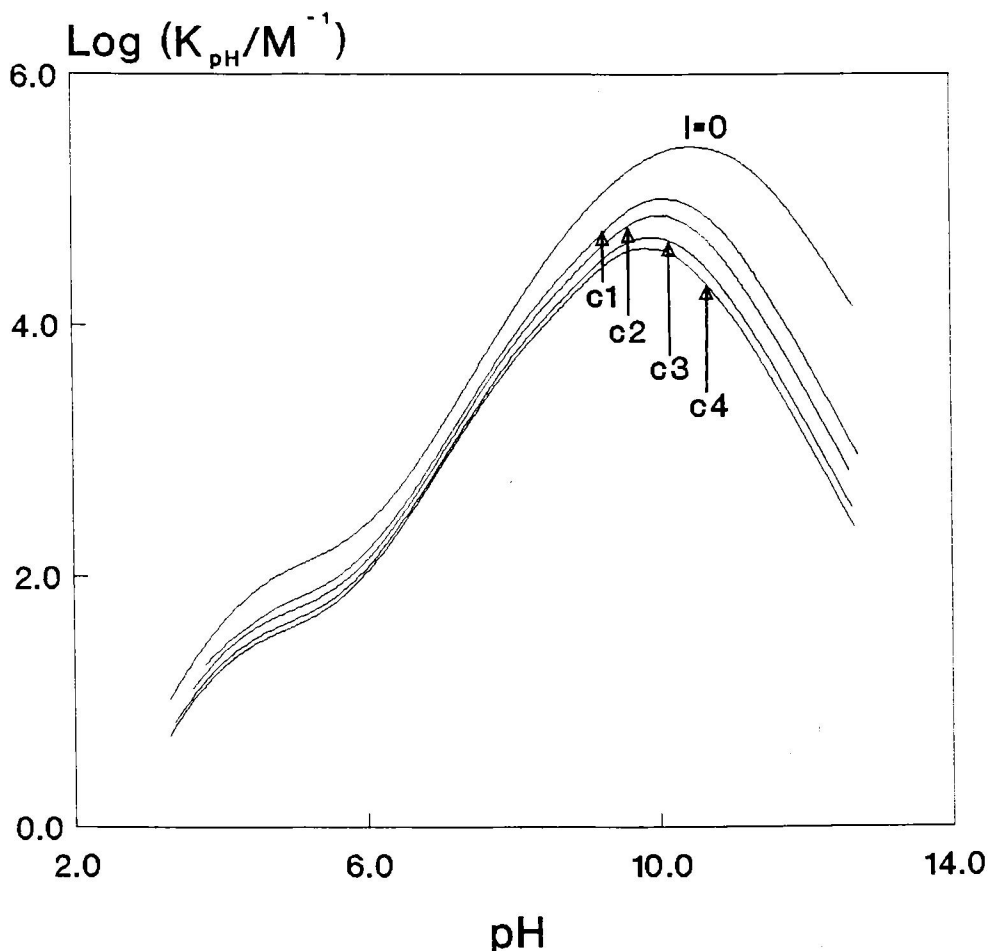


FIGURA 37.  $\text{Log } K_{\text{pH}}$  frente  $\text{pH}$  en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a  $25^\circ \text{C}$  a diferente fuerza iónica. Cada curva se ha calculado a partir de los datos experimentales de una valoración concreta con los  $\text{p}K_{\text{ip}}$ ,  $\text{p}K_{\text{ib}}$  y  $\text{p}K_{\text{M}}$  obtenidos de los ajustes (tabla 2) utilizando el  $\gamma_{\pm}$  correspondiente a cada  $\text{pH}$  (ecuación 52). Las concentraciones iniciales de PLP y n-hexilamina son:  $c_1 = 1.59 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_2 = 3.28 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c_3 = 6.67 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $c_4 = 9.79 \times 10^{-2} \text{ M}$ . La concentración de la disolución valorante de KOH es  $5.32 \times 10^{-2} \text{ M}$  en todos los casos; las valoraciones son las que se muestran en la figura 17. La curva superior se ha calculado igual que las anteriores pero considerando  $\gamma_{\pm} = 1$ , es decir, se trata del  $\text{log } K_{\text{pH}}$  que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero.

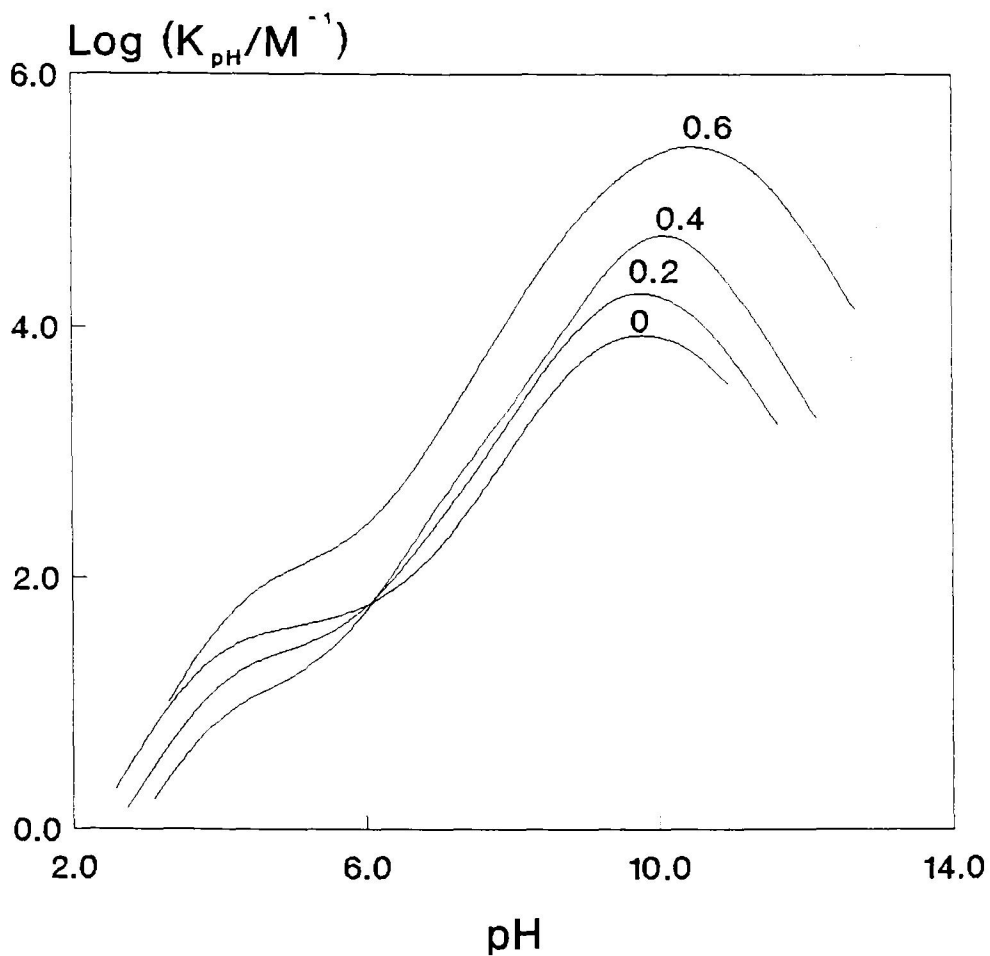


FIGURA 38.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  frente  $\text{pH}$  en mezclas agua-dioxano a  $25^\circ\text{C}$ . La fracción en volumen de dioxano se indica sobre cada curva. Cada una de estas curvas corresponden a las de  $\text{log } K_{\text{pH}}$  a fuerza iónica cero que se muestran en las figuras 34-37.



#### 4. 2. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO DE IONIZACION $K_{3b}$ DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL CON N-HEXILAMINA.

##### 4. 2. 1. FUNDAMENTO TEORICO.

La ionización de la base de Schiff entre las especies iónicas  $B_1$  y  $B_0$  tiene lugar a un pH muy básico, por encima de 11.5 en agua para una serie de bases de Schiff del PLP (Motekaitis y Martell (1982), Sánchez-Ruiz et al (1982) y Weng y Leussing (1983), no pudiéndose determinar por métodos potenciométricos. En cambio, es posible calcularla por espectrofotometría UV-Visible debido a los diferentes espectros de estas dos especies iónicas de la base de Schiff.

La especie iónica  $B_1$ , posee dos bandas de absorción en agua: una situada a 415 nm y otra a 276 nm correspondientes al tautómero cetoenammina, mayoritario en agua (sección 4. 1. 1.). El espectro de la especie  $B_1$  presenta también una banda de absorción minoritaria en el valle entre las bandas mayoritarias, aproximadamente a 330 nm, correspondiente al tautómero enolimina. La intensidad de esta banda aumenta a medida que disminuye la polaridad del disolvente (Shaltiel y Cortijo, 1970; Llor y Cortijo, 1977). La especie  $B_0$  tiene un espectro UV-Visible bastante diferente del anterior presentando su primera banda de absorción a 360 nm.

Esta diferencia entre los espectros de las especies  $B_1$  y  $B_0$  nos ha permitido determinar la constante de ionización  $K_{3b}$  mediante una valoración espectrofotométrica de una mezcla de PLP+n-hexilamina+base de Schiff en equilibrio realizada en el intervalo de pH al cual tiene lugar esta ionización: a partir de pH 10 en agua y de pH 11.5 en la mezcla con un 0.6 de fracción en volumen de dioxano (sección 4. 2. 2.). A estos valores de pH sólo están presentes las especies  $B_1$  y  $B_0$  ya que la ionización entre  $B_2$  y  $B_1$  tiene lugar a pH mucho más ácido: 6.87 en agua y 9.43 en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano (sección 4.1.4., tabla 2).

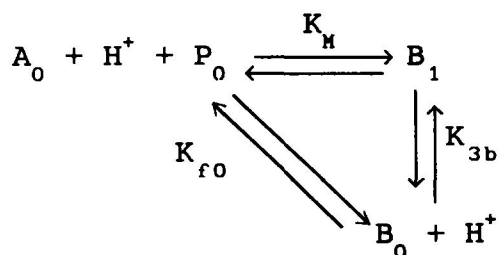
En principio, sería deseable llevar a cabo estas titulaciones espectrofotométricas con un gran exceso de n-hexilamina, para desplazar el equilibrio totalmente hacia la formación de la base de Schiff, lo cual facilitaría el análisis de datos. Nótese que, en el intervalo de pH de las titulaciones espectrofotométricas (entre 9.5 y 12.5 en agua pura y entre 11.5 y 14.8 en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano), la n-hexilamina no está protonada ya que su ionización tiene lugar a pH 10.58 en agua pura y a pH 9.89 en la mezcla del 0.6 de dioxano por lo que podría utilizarse un gran exceso de ésta sin aumentar la fuerza iónica del medio; el factor limitante es, sin embargo, su solubilidad que a estos valores de pH tan básicos disminuye. El exceso máximo permitido para que durante toda la valoración, es decir, al aumentar el pH, la n-hexilamina no precipite (0.03 M) no es suficiente para que el equilibrio esté totalmente desplazado hacia la formación de base de Schiff, y, como consecuencia tenemos

que considerar que existe una cierta cantidad de PLP en equilibrio con la imina. Lógicamente, el PLP estará totalmente deprotonado, especie  $P_0$ , pues su última ionización tiene lugar a pH más ácido: 9.04 en agua y 11.23 en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano (sección 4.1.4., tabla 2).

En resumen, aquí hemos obtenido la constante de ionización  $K_{3b}$  mediante una valoración espectrofotométrica de una disolución de PLP, n-hexilamina (con gran exceso de ésta) y base de Schiff en equilibrio a pH básico con una base fuerte muy concentrada, KOH, tomando espectros a diferentes intervalos de pH según la mezcla agua-dioxano considerada (figuras 39-42).

Hemos calculado  $K_{3b}$  a partir del análisis de la variación de la absorbancia a unas longitudes de onda determinadas en función del pH. Para esto necesitamos obtener una ecuación que nos relacione la absorbancia con el pH y con  $K_{3b}$ . Seguidamente describiremos el desarrollo efectuado para llegar a esta ecuación (ecuación 94).

A la vista de todo lo expuesto anteriormente las especies iónicas que tenemos que considerar en equilibrio son las siguientes:



ESQUEMA 7

Las ecuaciones de la constante de ionización  $K_{3b}$  y de la constante de formación individual  $K_{f0}$  son análogas al resto de constantes de equilibrio (ecuaciones 26, 27, 29, 30 y 31):

$$K_{3b} = \frac{a_{b0} \cdot a_H}{a_{b1}} = \frac{[B_0]}{[B_1]} \cdot \frac{\gamma_{b0}}{\gamma_{b1}} \cdot a_H \quad (75)$$

$$K_{f0} = \frac{a_{b0}}{a_{a0} \cdot a_{p0}} = \frac{[B_0]}{[A_0] \cdot [P_0]} \cdot \frac{\gamma_{b0}}{\gamma_{a0} \cdot \gamma_{p0}} \quad (76)$$

En el esquema 7 vemos que aparecen tres constantes de equilibrio relacionadas entre sí. Para analizar este sistema hemos elegido como constantes independientes  $K_M$  (ecuación 32) y  $K_{3b}$  pudiendo obtener  $K_{f0}$  a partir de ellas:

$$K_{f0} = K_M \cdot K_{3b} \quad (77)$$

Definimos las fracciones de las especies iónicas con respecto a la concentración total,  $c_t$ , como:

$$f_{b0} = \frac{[B_0]}{c_t} \quad (78)$$

$$f_{b1} = \frac{[B_1]}{c_t} \quad (79)$$

$$f_{p0} = \frac{[P_0]}{c_t} \quad (80)$$

siendo  $c_t$  la suma de la concentración total de PLP y de base de Schiff:

$$c_t = [B_0] + [B_1] + [P_0] \quad (81)$$

Introduciendo las fracciones de las especies iónicas,  $f_{b0}$ ,  $f_{b1}$  y  $f_{p0}$ , (ecuaciones 78-80) y aplicando el método utilizado para calcular los coeficientes de actividad explicado anteriormente (sección 3. 1., ecuación 11) en la expresión de  $K_{3b}$  (ecuación 71) tenemos que:

$$K_{3b} = \frac{f_{b0}}{f_{b1}} \cdot a_H \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (82)$$

$K_M$  viene dada por (sección 4. 1. 1.):

$$K_M = \frac{[B_1]}{[P_0] \cdot [A_0] \cdot a_H} \cdot \frac{\gamma_{b1}}{\gamma_{p0} \cdot \gamma_{a0}} \quad (32)$$

introduciendo en esta ecuación  $c_t$  y sustituyendo los coeficientes de actividad (ecuación 11),  $K_M$  se puede expresar en función de las fracciones  $f_{b1}$  y  $f_{p0}$  de la siguiente forma:

$$K_M = \frac{f_{b1}}{f_{p0} \cdot [A_0] \cdot a_H} \cdot (\gamma_{\pm})^{-5} \quad (83)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones 82 y 83 y que:

$$f_{b0} + f_{b1} + f_{p0} = 1 \quad (84)$$

las expresiones de  $f_{b0}$ ,  $f_{b1}$  y  $f_{p0}$  vendrán dadas por:

$$f_{b1} = \frac{1}{R} \quad (85)$$

$$f_{b0} = \frac{R_1}{R} \quad (86)$$

$$f_{p0} = \frac{R_2}{R} \quad (87)$$

donde:

$$R_1 = \frac{K_{3b}}{a_H} \cdot (\gamma_{\pm})^{-5} \quad (88)$$

$$R_2 = \left( K_H \cdot [A_0] \cdot a_H \cdot (\gamma_{\pm})^5 \right)^{-1} \quad (89)$$

$$R = 1 + R_1 + R_2 \quad (90)$$

La concentración de  $A_0$  será:

$$[A_0] = a_0 \cdot [A]_t \quad (91)$$

siendo  $a_0$  la fracción de la especie  $A_0$  referida a la concentración total de n-hexilamina (ecuación 42) que en el intervalo de pH considerado vale aproximadamente uno ya que su ionización tiene lugar a un pH más ácido. Como todos los experimentos se han realizado con un gran exceso de n-hexilamina (concentraciones entre 200 y 600 veces mayor que la de PLP) podemos despreciar la

concentración de n-hexilamina que está formando la base de Schiff frente a la que queda libre y suponer que ésta permanece constante en el transcurso de la valoración (considerando, por supuesto, la dilución debida a la adición de KOH).

La absorbancia,  $A$ , a cualquier longitud de onda en cualquier momento de la valoración viene dada por la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = l \cdot \sum_i c_i \cdot \epsilon_i \quad (92)$$

donde  $l$  es el espesor de la muestra atravesado por la luz (en nuestro caso 1 cm y se omitirá a partir de ahora),  $c_i$  la concentración de la sustancia  $i$  que absorbe y  $\epsilon_i$  el coeficiente de extinción molar de la sustancia  $i$  a esa longitud de onda (en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Para obtener la ecuación de la absorbancia hemos de tener en cuenta todas las especies iónicas presentes en el medio que absorben radiación a la longitud de onda considerada. Estas especies son, como ya se ha descrito:  $P_0$ ,  $B_1$  y  $B_0$ . Por lo tanto la absorbancia vendrá dada por:

$$A = c_t \cdot \left( \epsilon_{b0} \cdot f_{b0} + \epsilon_{b1} \cdot f_{b1} + \epsilon_{p0} \cdot f_{p0} \right) \quad (93)$$

siendo  $\epsilon_{b0}$ ,  $\epsilon_{b1}$  y  $\epsilon_{p0}$  los coeficientes de extinción de  $B_0$ ,  $B_1$  y  $P_0$ .

Sustituyendo las expresiones 85-90 y 93 en la ecuación 92:

$$A = \left[ \frac{R_1 \cdot \epsilon_{b0} + \epsilon_{b1} + R_2 \cdot \epsilon_{p0}}{R} \right] \cdot c_t \quad (94)$$

Esta ecuación junto con las ecuaciones 88-90 nos dan la absorbancia teórica a una longitud de onda dada en función del pH, de la concentración de la especie sin protonar de la amina, de  $K_{3b}$ , de  $K_M$  y de los coeficientes de extinción de las especies iónicas y nos permite obtener  $K_{3b}$  mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos experimentales de absorbancia y pH.

#### 4. 2. 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Las valoraciones se han realizado a 25 °C bajo atmósfera de nitrógeno y en la oscuridad partiendo en todos los casos de un volumen inicial de 25 mls. El sistema empleado para añadir el agente valorante, KOH, ya ha sido descrito anteriormente (sección 3. 2.).

En cada mezcla agua-dioxano se realizaron dos valoraciones a la misma concentración inicial de PLP ( $5 \cdot 10^{-5}$  M) y distinta de n-hexilamina (0.01 M y 0.03 M) que se utilizó como tal (no en forma de clorhidrato como en los casos anteriores). El pH inicial de estas disoluciones se encontraba entre 11.7 (agua pura con amina 0.01 M) y 12.8 (mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano con amina 0.03 M). Este valor para el pH inicial era demasiado básico para comenzar la titulación espectrofotométrica por lo cual hubo que añadir ácido clorhídrico cuya concentración estuvo entre 0.004 M y 0.01 M según la disolución de partida considerada consiguiendo así valores de pH inicial entre 9.5 (agua



pura) y 11.5 (mezcla del 0.6). A cada una de estas disoluciones se le iba añadiendo KOH muy concentrada (1 M) estando el volumen de cada adición entre 0.03 mls y 1 ml según la mezcla agua-dioxano y el pH considerados. El volumen total de KOH añadido oscilaba entre 0.5 mls (agua pura con n-hexilamina inicial de 0.01 M) y 2.9 mls (mezcla del 0.6 con n-hexilamina inicial de 0.03 M). Trás cada adición de KOH se mantenía agitación hasta homogeneidad de la disolución y se tomaba el valor de la lectura del pH-metro, B, (sin agitación) cuando era estable. Entonces se extraía una porción de 2 mls y se registraba el espectro UV-Visible (figuras 39-42).

En agua pura y en las mezclas de 0.2 y 0.4 de fracción en volumen de dioxano la disolución inicial de PLP y n-hexilamina y la de KOH se prepararon con la misma proporción de dioxano con lo cual ésta se mantenía constante en el transcurso de la valoración. Debido a la alta concentración de la disolución de KOH utilizada (1 M), no se pudo preparar directamente en la mezcla del 0.6 porque no lo permite su solubilidad en esta mezcla. En este caso se preparó una disolución de KOH 1.2 M en agua y trás cada adición de la misma se añadía exactamente el volumen de dioxano necesario para mantener constante la proporción de la mezcla.

#### 4. 2. 3. ANALISIS DE DATOS.

La expresión que nos da la absorbancia teórica (ecuación 94) nos permite obtener la constante de equilibrio de ionización  $K_{3b}$  mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos

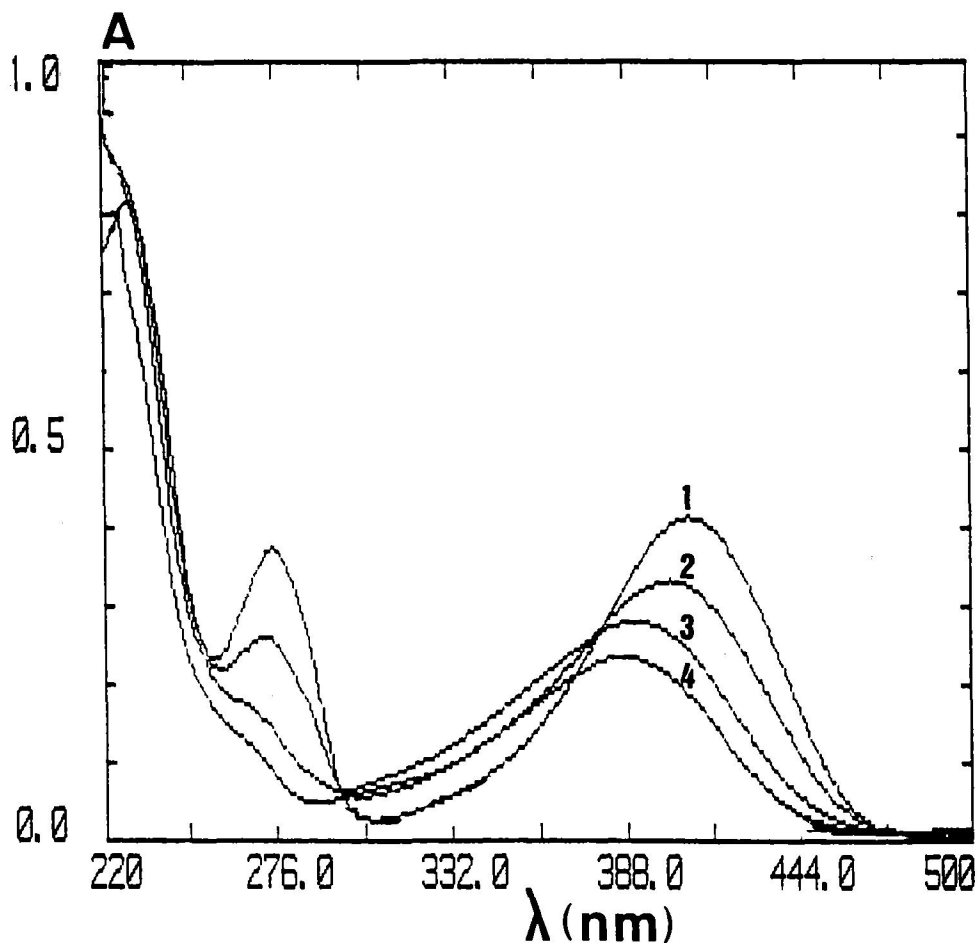


FIGURA 39. Espectro UV-Visible de la disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio a diferente pH en agua pura a 25 °C. A la disolución de partida (25 mls) se le iba añadiendo KOH 1 M hasta alcanzar el pH deseado, momento en que se extraía una porción de 2 mls y se registraba su espectro UV-Visible. La concentración inicial de n-hexilamina es 0.01 M y la de PLP  $8 \times 10^{-5}$  M. Los valores de pH de los espectros representados en la figura son: 1 = 9.53, 2 = 11.90, 3 = 12.07 y 4 = 12.45.

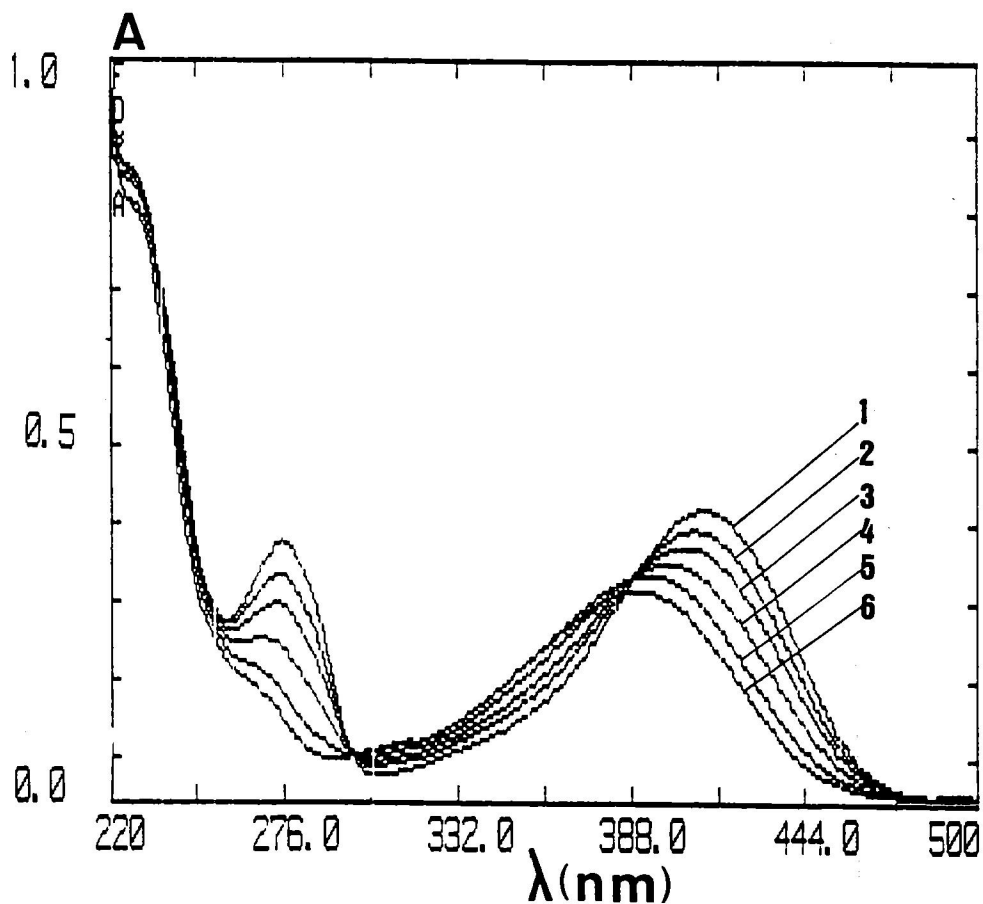
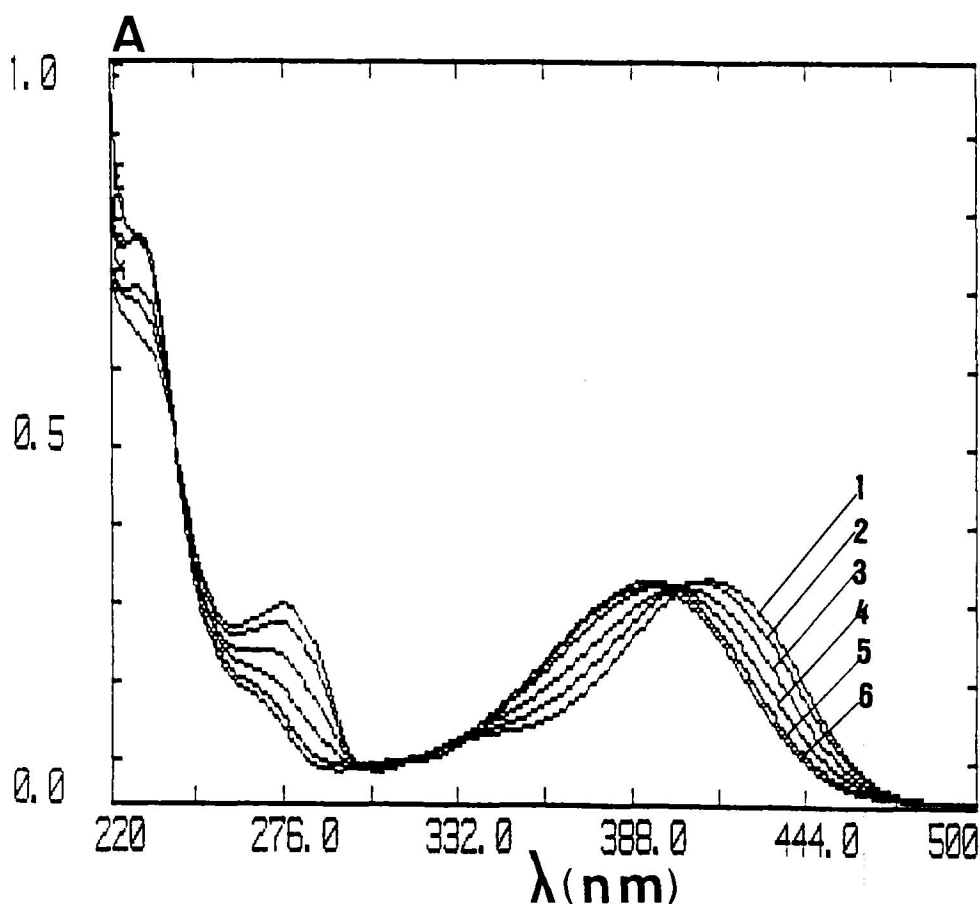


FIGURA 40. Espectro UV-Visible de la disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio a diferente pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. A la disolución de partida (25 mls) se le iba añadiendo KOH 1 M hasta alcanzar el pH deseado, momento en que se extraía una porción de 2 mls y se registraba su espectro UV-Visible. La concentración inicial de n-hexilamina es 0.01 M y la de PLP  $8 \times 10^{-5}$  M. Los valores de pH de los espectros representados en la figura son: 1 = 10.06, 2 = 11.54, 3 = 11.88, 4 = 12.10, 5 = 12.43 y 6 = 12.74.



**FIGURA 41.** Espectro UV-Visible de la disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio a diferente pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. A la disolución de partida (25 mls) se le iba añadiendo KOH 1 M hasta alcanzar el pH deseado, momento en que se extraía una porción de 2 mls y se registraba su espectro UV-Visible. La concentración inicial de n-hexilamina es 0.01 M y la de PLP  $8 \times 10^{-5}$  M. Los valores de pH de los espectros representados en la figura son: 1 = 10.87, 2 = 12.64, 3 = 13.05, 4 = 13.40, 5 = 13.60 y 6 = 13.76.

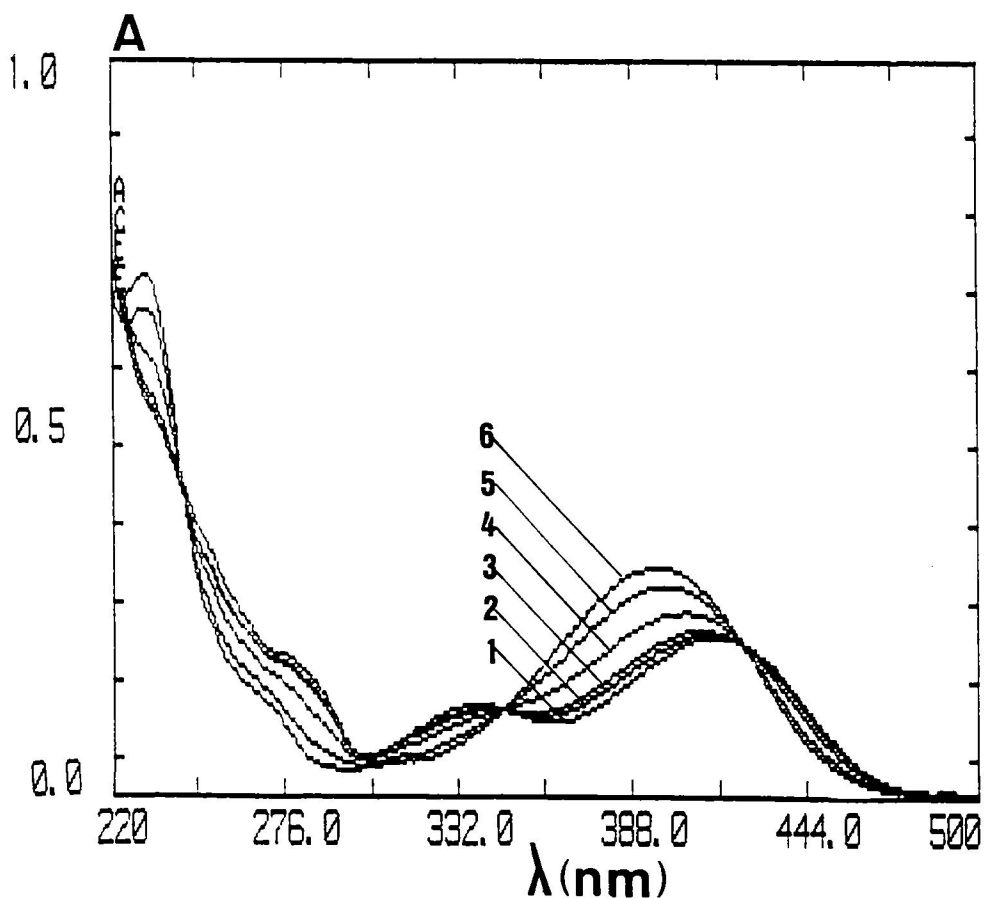


FIGURA 42. Espectro UV-Visible de la disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio a diferente pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. A la disolución de partida (25 mls) se le iba añadiendo KOH 1.2 M en disolución acuosa, y el volumen apropiado de dioxano para mantener la proporción de la mezcla, hasta alcanzar el pH deseado, momento en que se extraía una porción de 2 mls y se registraba su espectro UV-Visible. La concentración inicial de n-hexilamina es 0.01 M y la de PLP  $8 \times 10^{-5}$  M. Los valores de pH de los espectros representados en la figura son: 1 = 11.45, 2 = 12.82, 3 = 13.12, 4 = 13.62, 5 = 14.19 y 6 = 14.70.

experimentales de pH y absorbancia. Para ello hemos utilizado el P.G.P. (programa descrito en la sección 3. 3.) escribiendo la subrutina adecuada. Esta subrutina permite el cálculo de la absorbancia (variable dependiente) en términos del pH (variable independiente), de los parámetros ( $pK_{3b}$ ,  $pK_H$ ,  $\epsilon_{b0}$ ,  $\epsilon_{b1}$  y  $\epsilon_{p0}$ ) y de la concentración inicial de n-hexilamina (variable independiente adicional).

Para calcular la absorbancia (ecuaciones 88-90 y 94) se necesitan los coeficientes de actividad que podremos determinar si conocemos la fuerza iónica de la disolución que depende de las constantes de ionización y, por lo tanto, de  $\gamma_{\pm}$ . Es necesario, por tanto, plantear un ciclo iterativo que calcule el valor de  $\gamma_{\pm}$  para cada pH. La ecuación de la fuerza iónica es la siguiente:

$$I = \frac{1}{2} \left[ [K^+] + [OH^-] + [H^+] + [Cl^-] + [A_1] + 9[P_0] + 4[B_1] + 9[B_0] \right] \quad (95)$$

En cada momento de la valoración el balance de carga será:

$$[K^+] + [H^+] + [A_1] = [OH^-] + [Cl^-] + 3[P_0] + 2[B_1] + 3[B_0] \quad (96)$$

Despejando  $[K^+]$  e introduciendo su valor en la ecuación de la fuerza iónica (95) tenemos que:

$$I = [OH^-] + [Cl^-] + [P]_t \cdot I_p + [B]_t \cdot I_b \quad (97)$$

donde  $[P]_t \cdot I_p$  y  $[B]_t \cdot I_b$  son las fuerzas iónicas totales aportadas por el PLP y la base de Schiff respectivamente.

$I_p$  e  $I_b$  quedan expresadas como:

$$I_p = 6 \cdot p_0 \quad (98)$$

$$I_b = 3 \cdot b_1 + 6 \cdot b_0 \quad (99)$$

Para calcular la fuerza iónica (ecuación 97) vemos que es necesario obtener previamente  $[B]_t$  y  $[P]_t$ , para ello vamos a utilizar la constante de equilibrio aparente  $K_{pH}$  (ecuación 33) que teniendo en cuenta las especies iónicas presentes será:

$$K_{pH} = \frac{[B]_t}{[P]_t \cdot [A]_t} = \frac{[B_1] + [B_0]}{[P_0] \cdot ([A_0] + [A_1])} \quad (100)$$

A partir de la ecuación de la constante de ionización  $K_{3b}$  (ecuación 75) y teniendo en cuenta los coeficientes de actividad, las fracciones de las especies iónicas de la base de Schiff,  $b_0$  y  $b_1$ , vendrán dadas por:

$$b_0 = \left( 1 + \frac{a_H}{K_{3b}} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \right)^{-1} \quad (101)$$

$$b_1 = b_0 \cdot \frac{a_H}{K_{3b}} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (102)$$

Sustituyendo  $b_0$ ,  $b_1$  y  $p_0$  (ecuación 12) en 98 y 99 tenemos  $I_b$  e  $I_p$  en función del pH, de las constantes de ionización y de  $\gamma_{\pm}$ .

Introduciendo las mismas ecuaciones (incluyendo también las

correspondientes a la n-hexilamina, 47, 48 y 49) en  $K_{pH}$  tenemos:

$$K_{pH} = \frac{[B_0]}{[P_0] \cdot [A_0] \cdot Z_a \cdot b_0} \quad (103)$$

donde  $Z_a$  ya ha sido definido como (sección 4. 1. 1.):

$$Z_a = 1 + \frac{a_H}{K_N} \cdot (\gamma_{\pm})^{-1} \quad (49)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones 76 y 77 tenemos que  $K_{pH}$  será:

$$K_{pH} = \frac{K_M \cdot K_{3b}}{Z_a \cdot b_0} \quad (104)$$

Por otro lado, en todo momento se cumplirá que:

$$[P]_t = c_t - [B]_t \quad (105)$$

Sustituyendo en  $K_{pH}$  (ecuación 100) la concentración total de PLP (ecuación 105) podemos despejar  $[B]_t$ :

$$[B]_t = \frac{K_{pH} \cdot c_t \cdot [A]_t}{1 + K_{pH} \cdot [A]_t} \quad (106)$$

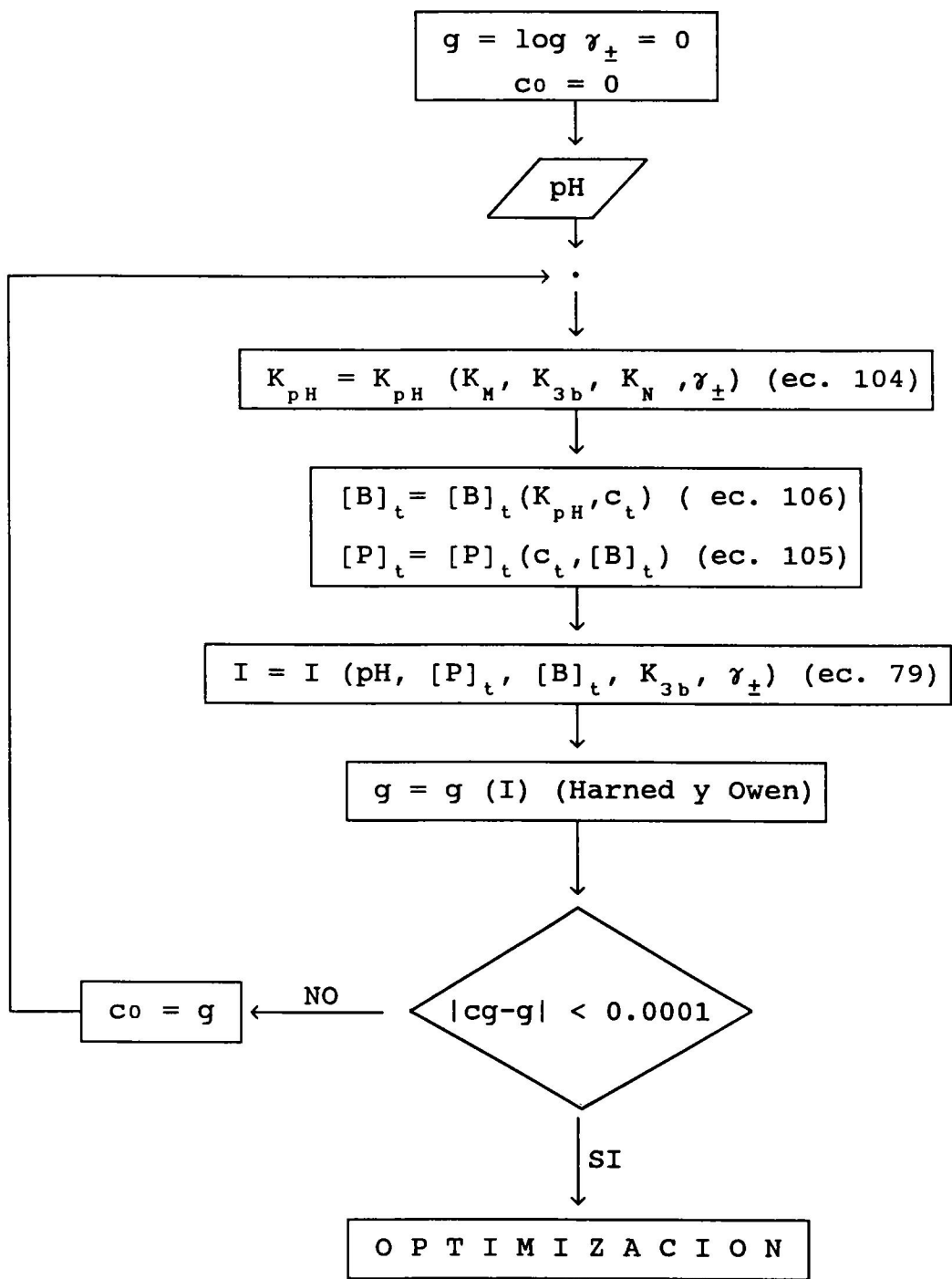
Una vez obtenidos  $[B]_t$  y  $[P]_t$  ya podemos calcular la fuerza iónica (ecuación 97).

Vemos que es necesario conocer el valor de  $\gamma_{\pm}$  para cada pH y



que este valor viene determinado por la fuerza iónica que a su vez depende de él. Es necesario, pues, plantear un procedimiento iterativo que calcule  $\gamma_{\pm}$ . En el primer ciclo comenzamos suponiendo  $\gamma_{\pm} = 1$ . Con este valor calculamos  $K_{\text{pH}}$  (ecuación 104),  $[B]_t$  (ecuación 106),  $[P]_t$  (ecuación 105) y la fuerza iónica (ecuación 97). Con el valor de  $I$  calculamos  $\gamma_{\pm}$  a partir de los datos de Harned y Owen y éste será el  $\gamma_{\pm}$  que se utilizará de partida en el segundo ciclo. El procedimiento iterativo termina cuando los  $\gamma_{\pm}$  calculados en dos ciclos sucesivos difieren en menos de 0.001 (en el esquema 8 se muestra el diagrama de flujo de la subrutina y en el apéndice II. 3. su código fuente). Una vez completado el procedimiento iterativo para cada valor de pH se calcula la absorbancia teórica (ecuación 94) utilizando los valores que los parámetros tengan en ese momento del ajuste y se pasa al proceso de optimización.

En cada mezcla agua-dioxano se hicieron ajustes simultáneos a los datos experimentales de absorbancia a una longitud de onda dada y pH con las dos valoraciones a diferente concentración de *n*-hexilamina inicial. Para cada mezcla se llevaron a cabo tres ajustes a tres longitudes de onda distintas a las que la variación total de absorbancia era máxima (412, 360 y 276 nm). En estos ajustes se dejaron como parámetros libres  $\text{p}K_{3b}$ ,  $\epsilon_{b0}$ ,  $\epsilon_{b1}$  y  $\epsilon_{p0}$  y se fijó  $\text{p}K_M$  en el valor determinado anteriormente (sección 4. 1. 4., tabla 2). Así hemos obtenido la constante de ionización  $K_{3b}$  de la base de Schiff y, por lo tanto, la constante de formación individual  $K_{f0}$  (ecuación 77), que mejor ajusta la expresión de la absorbancia teórica a nuestros datos experimentales.



ESQUEMA 8

#### 4. 2. 4. RESULTADOS.

Utilizando el método descrito en la sección anterior hemos obtenido la constante de ionización  $K_{3b}$  de la base de Schiff formada entre el PLP y la n-hexilamina en agua pura y en las mezclas con 0.2, 0.4 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

En el programa hemos introducido como parámetros  $pK_M$ ,  $pK_{3b}$  y los coeficientes de extinción de las especies iónicas. En cada mezcla se hicieron tres ajustes a tres longitudes de onda distintas (412, 360 y 276 nm) elegidas por ser a las cuales la absorbancia sufría un cambio mayor al modificar el pH, como se puede observar en las figuras 39-42 donde se presentan los espectros UV-Visible para las distintas mezclas. En los ajustes se fijó  $pK_M$  en el valor obtenido anteriormente (sección 4.1.4., tabla 2) y se dejaron como parámetros ajustables  $pK_{3b}$ ,  $\epsilon_{b0}$ ,  $\epsilon_{b1}$  y  $\epsilon_{p0}$ .

Los resultados de los ajustes están dados en las figuras 43-46. Podemos observar que en agua pura los ajustes son bastante buenos pero que al ir aumentando la proporción de dioxano del disolvente las diferencias entre las curvas teóricas y los puntos experimentales se van haciendo mayores. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta las consideraciones hechas sobre la fuerza iónica a la que estamos trabajando (hasta 0.04 en agua pura y en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano y hasta 0.07 en las mezclas de 0.2 y de 0.4) y las cargas de las especies iónicas que tenemos en el medio:  $B_1^{2-}$ ,  $B_0^{3-}$  y  $P_0^{3-}$ , con lo cual podemos suponer que en las mezclas ricas en dioxano podrían

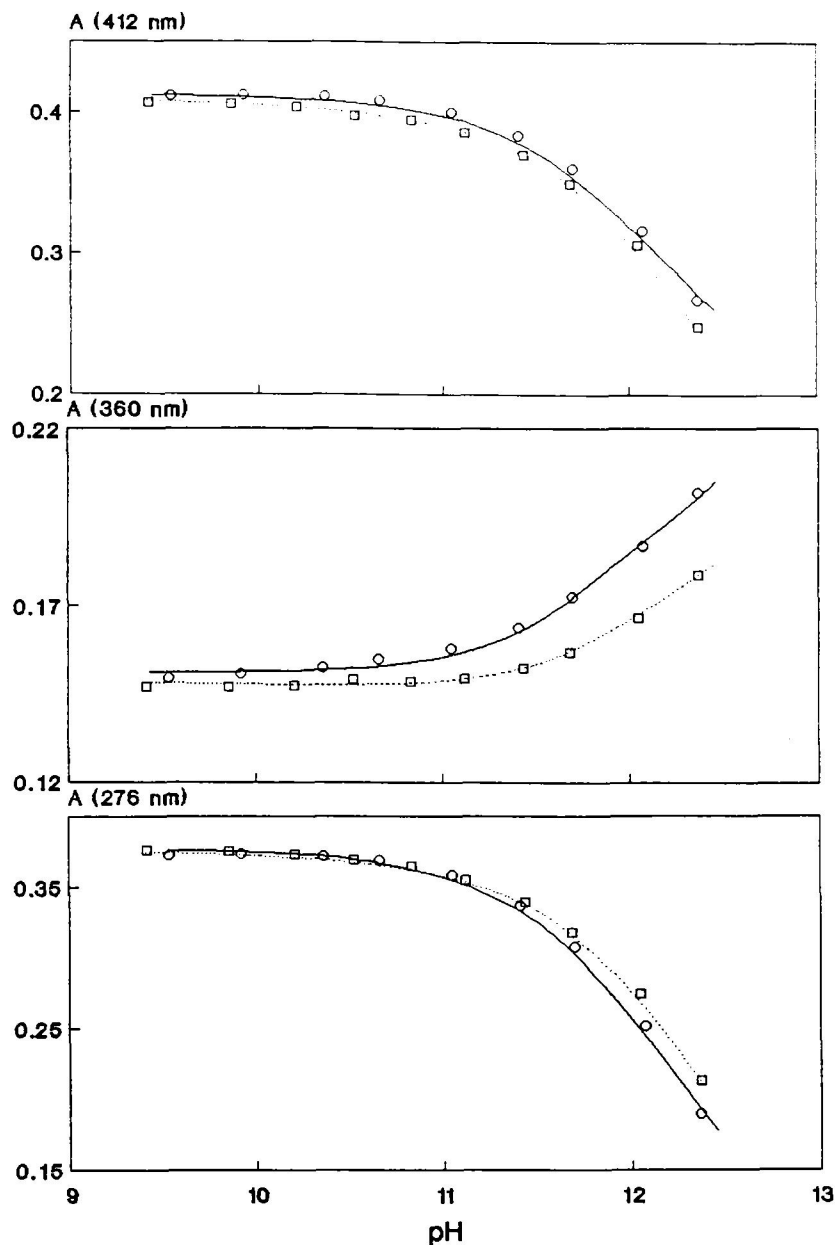


FIGURA 43. Absorbancia de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente a pH en agua pura a 25 °C. o son los datos experimentales para concentración inicial de amina 0.01 M y ◻ para 0.03 M. Cada punto corresponde a la absorbancia, a la longitud de onda indicada en la figura, de un espectro obtenido como se muestra en la figura 39. — es la curva predicha por la ecuación 94 y el  $pK_{3b}$  procedente del ajuste (tabla 3) para 0.01 M y - - - para 0.03 M. La concentración inicial de PLP es  $8 \times 10^{-5}$  M.

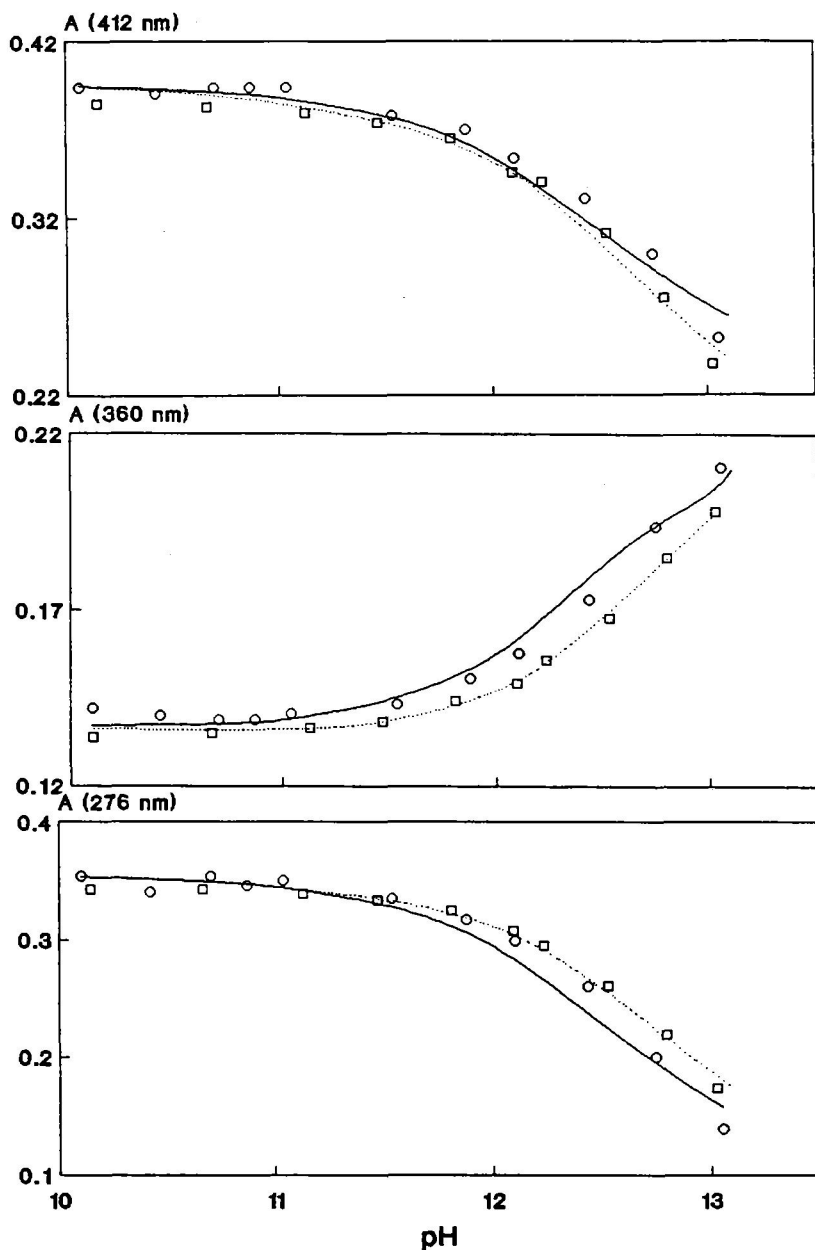


FIGURA 44. Absorbancia de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente a pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. o son los datos experimentales para concentración inicial de amina 0.01 M y  $\square$  para 0.03 M. Cada punto corresponde a la absorbancia, a la longitud de onda indicada en la figura, de un espectro obtenido como se muestra en la figura 40. — es la curva predicha por la ecuación 94 y el  $pK_{3b}$  procedente del ajuste (tabla 3) para 0.01 M y - - - para 0.03 M. La concentración inicial de PLP es  $8 \times 10^{-5}$  M.

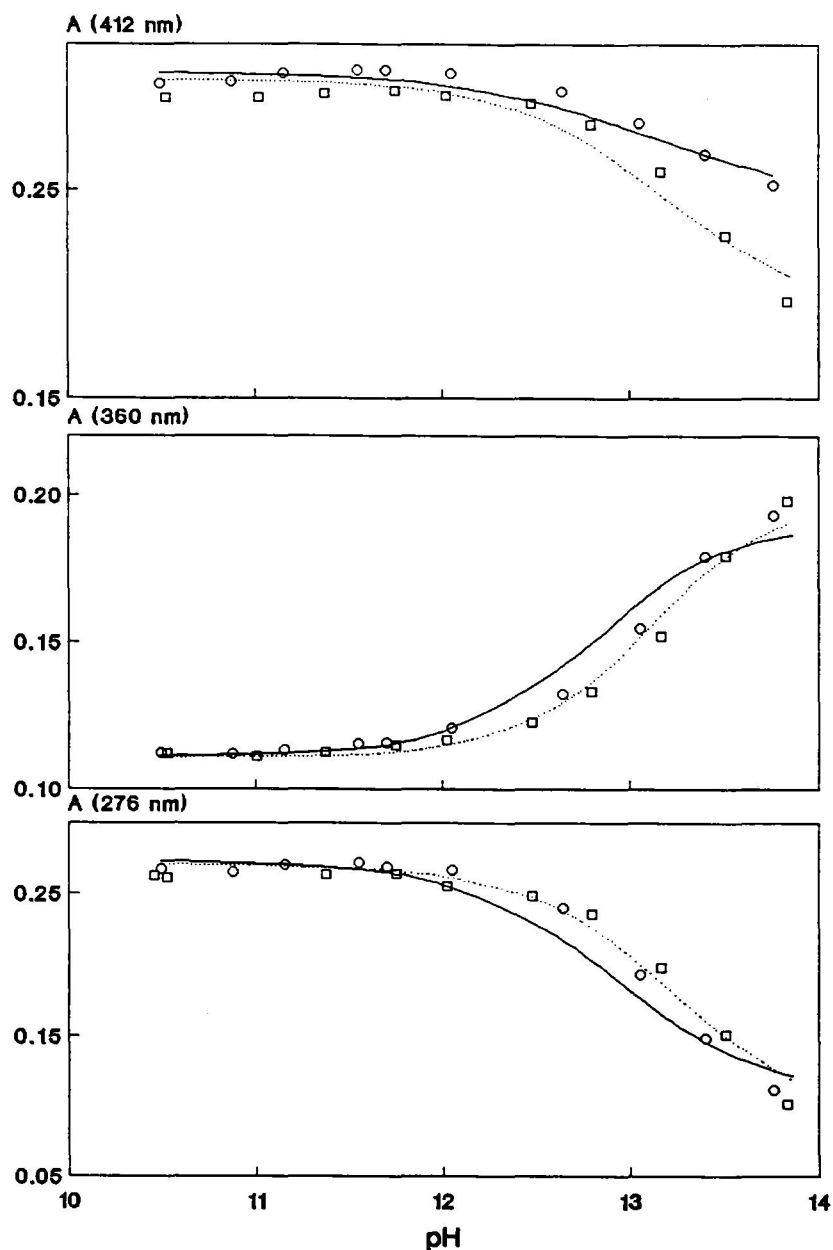


FIGURA 45. Absorbancia de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente a pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. o son los datos experimentales para concentración inicial de amina 0.01 M y  $\square$  para 0.03 M. Cada punto corresponde a la absorbancia, a la longitud de onda indicada en la figura, de un espectro obtenido como se muestra en la figura 41. — es la curva predicha por la ecuación 94 y el  $pK_{3b}$  procedente del ajuste (tabla 3) para 0.01 M y - - - para 0.03 M. La concentración inicial de PLP es  $8 \times 10^{-5}$  M.

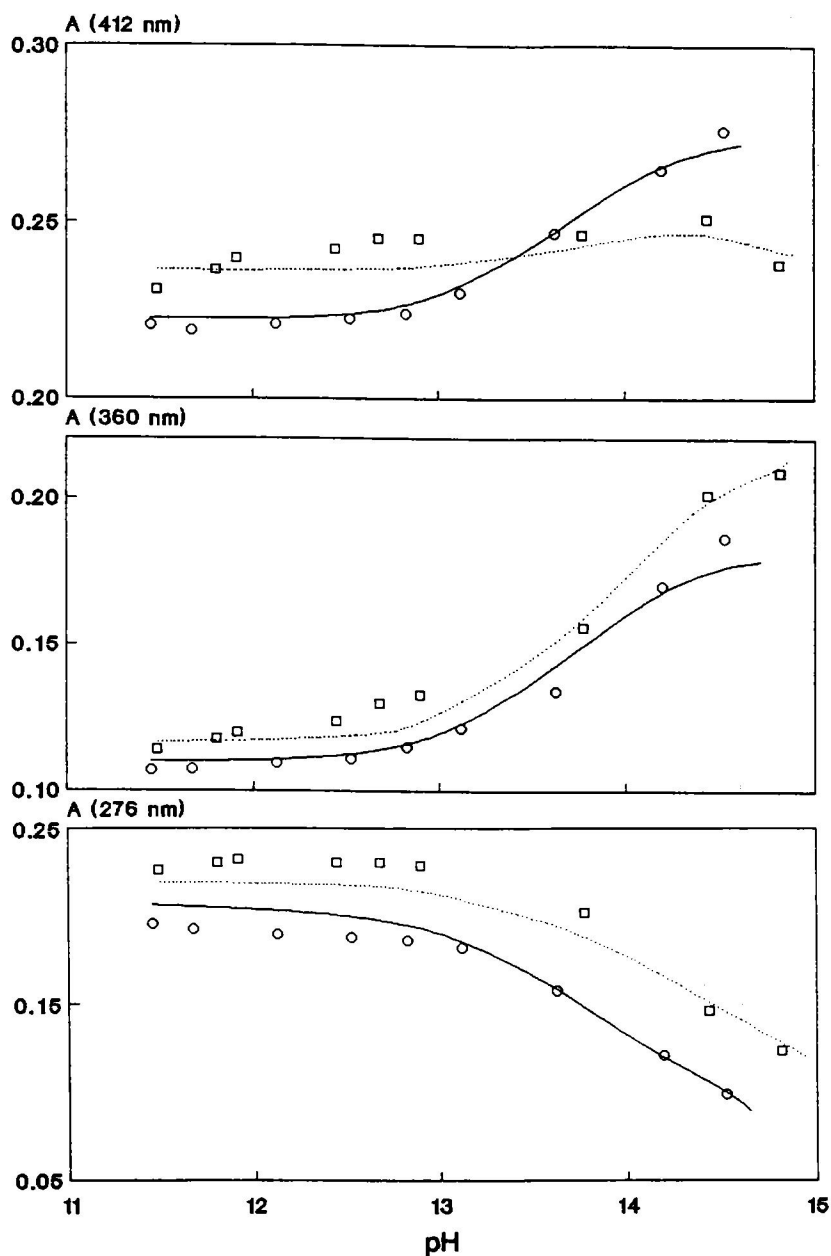


FIGURA 46. Absorbancia de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio frente a pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. o son los datos experimentales para concentración inicial de amina 0.01 M y  $\square$  para 0.03 M. Cada punto corresponde a la absorbancia, a la longitud de onda indicada en la figura, de un espectro obtenido como se muestra en la figura 42. — es la curva predicha por la ecuación 94 y el  $pK_{3b}$  procedente del ajuste (tabla 3) para 0.01 M y - - - para 0.03 M. La concentración inicial de PLP es  $8 \times 10^{-5}$  M.

existir asociaciones iónicas muy fuertes, de esto se deduce que los coeficientes de actividad determinados deben de considerarse como estimaciones y, por consiguiente, también los valores de  $pK_{3b}$ . En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos a las tres longitudes de onda analizadas.

En las figuras 47-50 hemos representado las fracciones de las especies iónicas de la base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ , y  $b_3$ , calculadas a partir de  $pK_{1b}$  y  $pK_{2b}$ , obtenidos mediante las valoraciones potenciométricas (sección 4. 1. 4., tabla 2), y de  $pK_{3b}$ , obtenido con la titulación espectrofotométrica (tabla 3) considerando  $\gamma_{\pm}=1$ , es decir, fuerza iónica cero.

En las figuras 51-54 se representa  $\log K_{pH}^0$  frente al pH para cada una de las mezclas. Este  $\log K_{pH}^0$  se ha calculado con las constantes de equilibrio termodinámicas  $K_{1p}$ ,  $K_{1b}$ ,  $K_{2b}$  y  $K_M$  calculadas en la sección 4. 1. 4. (tabla 2) y  $K_{3b}$  obtenida aquí (tabla 3), considerando la fuerza iónica igual a cero, es decir,  $\gamma_{\pm}=1$ . La ecuación de  $K_{pH}^0$  se obtiene a partir de la ecuación 33 (sección 4. 1. 1.):

$$K_{pH} = \frac{[B]_t}{[P]_t \cdot [A]_t} \quad (33)$$

teniendo en cuenta todas las especies iónicas de la base de Schiff, es decir:

$$[B]_t = [B_0] + [B_1] + [B_2] + [B_3] \quad (107)$$



TABLA 3. Valores óptimos de  $pK_{3b}$  a las tres longitudes de onda estudiadas, obtenidos a partir de las valoraciones espectrofotométricas del sistema en equilibrio PLP + n-hexilamina + base de Schiff a 25 °C en mezclas agua dioxano. En la tabla se da también el valor medio de  $pK_{3b} \pm \sigma$  (desviación estándar), éste es el que se ha utilizado en todos los cálculos posteriores en los que interviene este  $pK$ .  $\Phi_D$  representa la fracción en volumen de dioxano.

$\Phi_D$	$pK_{3b}$			Valor medio $\pm \sigma$
	412 nm	360 nm	276 nm	
0	12.88	12.68	12.88	12.81 $\pm$ 0.12
0.2	13.73	14.36	14.31	14.13 $\pm$ 0.35
0.4	14.19	14.82	14.78	14.60 $\pm$ 0.35
0.6	15.29	15.53	15.68	15.50 $\pm$ 0.20

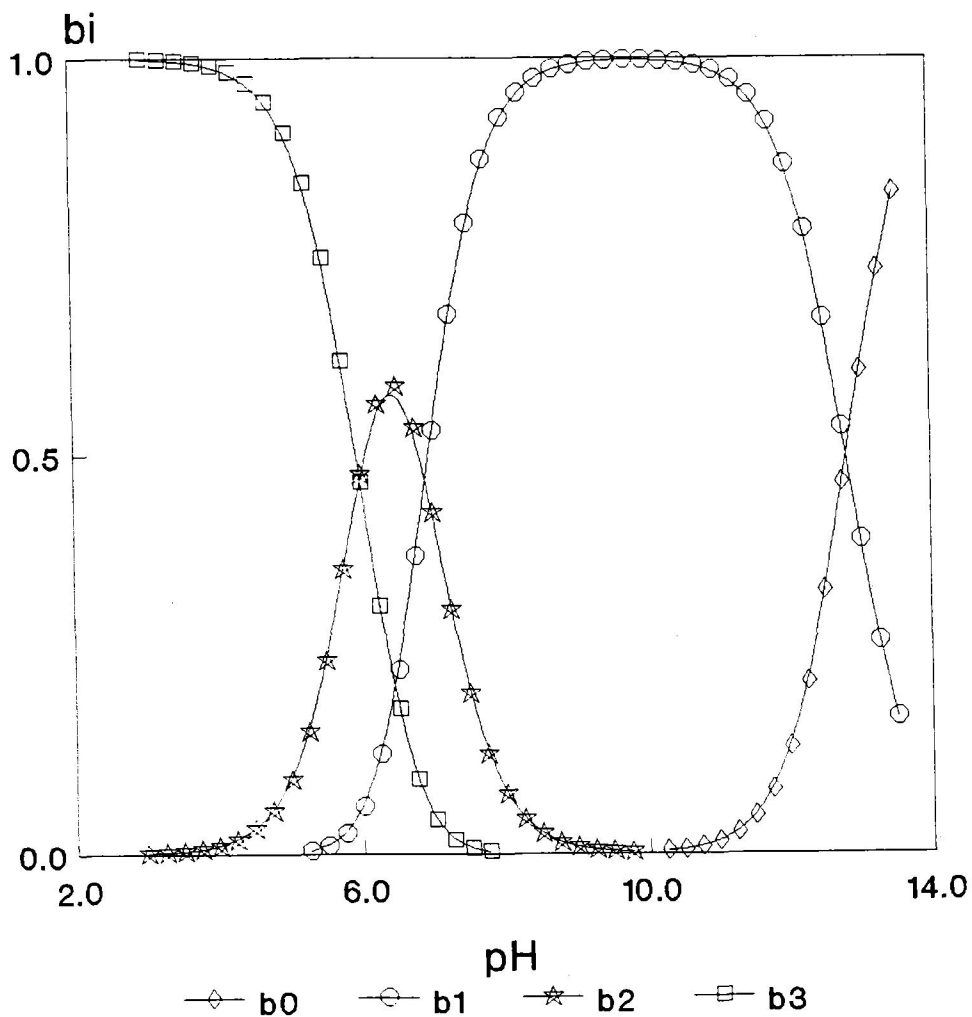
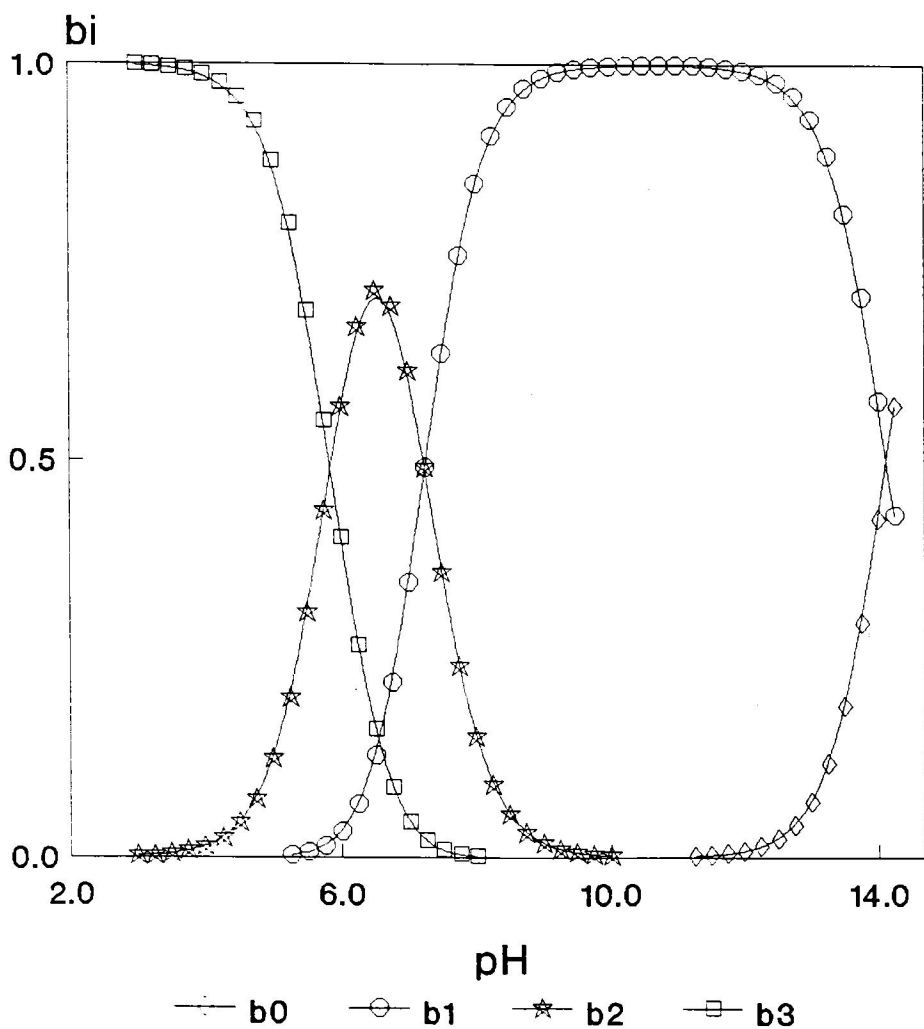


FIGURA 47. Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en agua pura a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de la base de Schiff con los valores de  $pK_{1b}$ ,  $pK_{2b}$  (sección 4.1.4., tabla 2) y de  $pK_{3b}$  obtenidos en los ajustes (tabla 3) y  $\gamma_{\pm} = 1$ , por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.



**FIGURA 48.** Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de la base de Schiff con los valores de  $pK_{1b}$ ,  $pK_{2b}$  (sección 4.1.4., tabla 2) y de  $pK_{3b}$  obtenidos en los ajustes (tabla 3) y  $\gamma_{\pm} = 1$ , por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

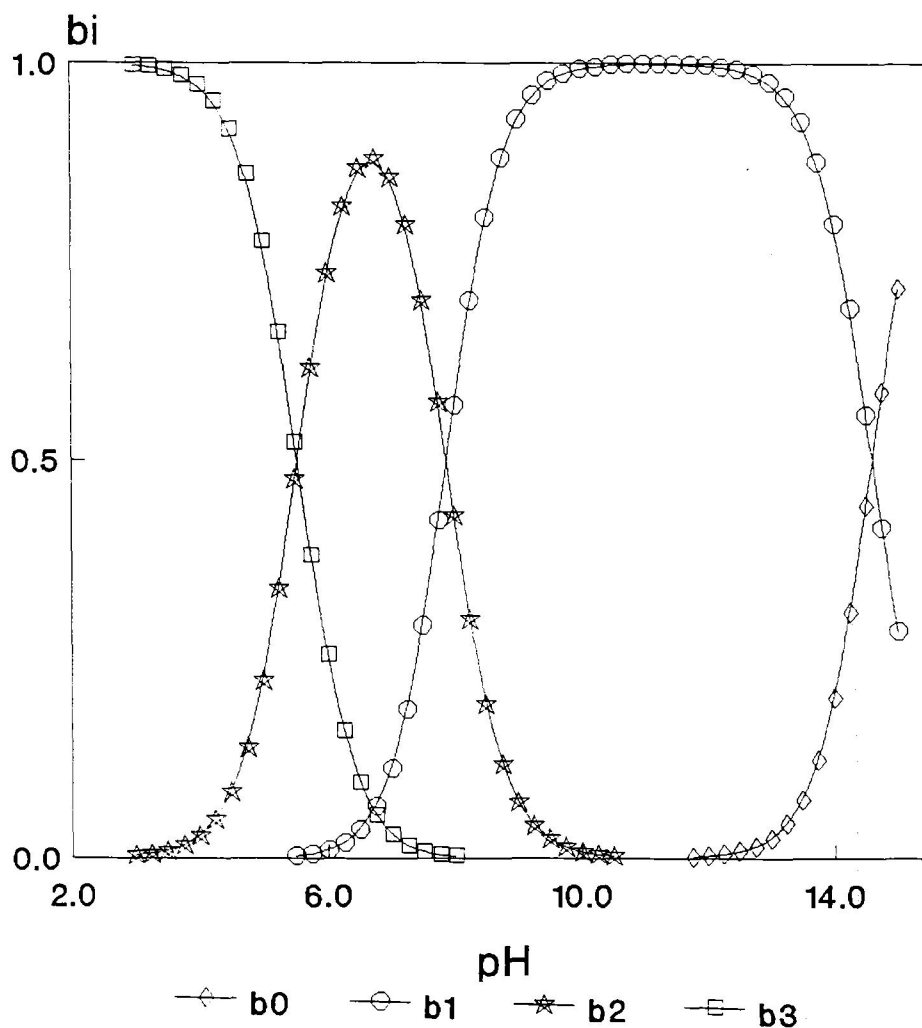


FIGURA 49. Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de la base de Schiff con los valores de  $pK_{1b}$ ,  $pK_{2b}$  (sección 4.1.4., tabla 2) y de  $pK_{3b}$  obtenidos en los ajustes (tabla 3) y  $\gamma_{\pm} = 1$ , por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

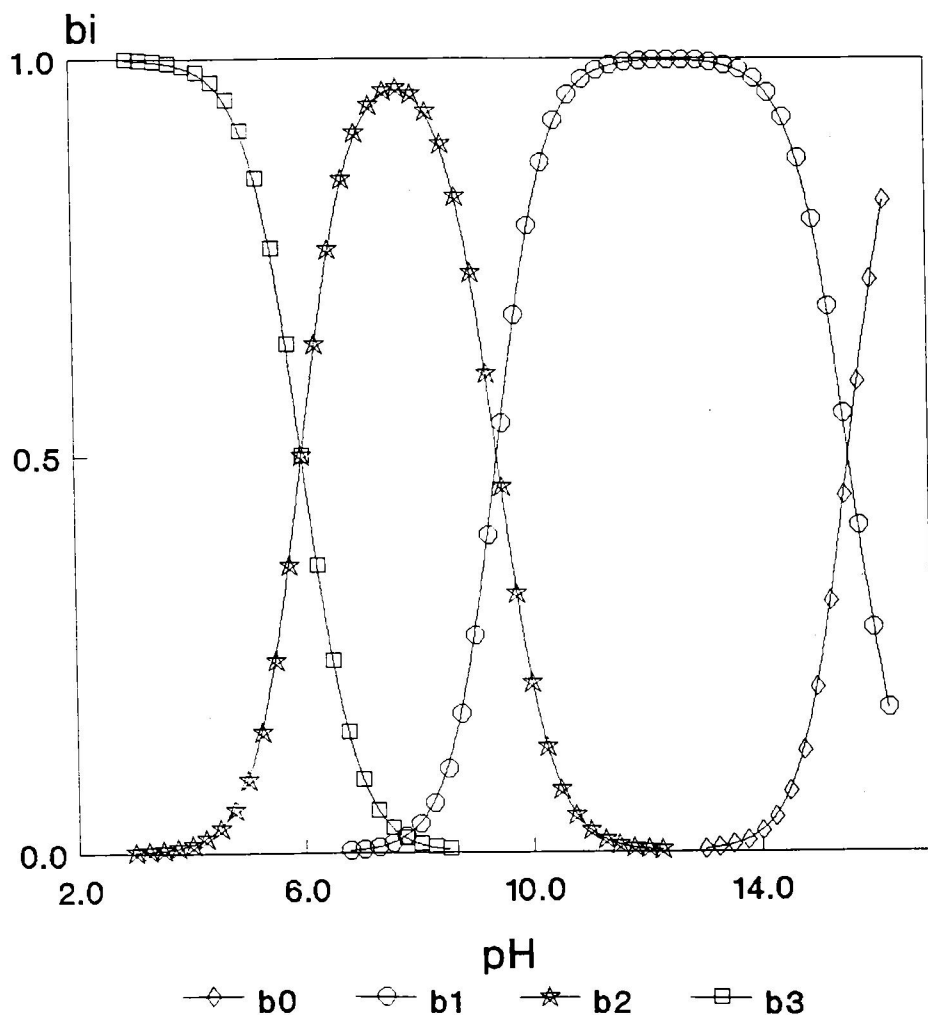


FIGURA 50. Fracciones de las especies iónicas de base de Schiff referidas a la concentración total de base de Schiff,  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$ , frente al pH en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Estas fracciones se han calculado suponiendo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la formación de la base de Schiff con los valores de  $pK_{1b}$ ,  $pK_{2b}$  (sección 4.1.4., tabla 2) y de  $pK_{3b}$  obtenidos en los ajustes (tabla 3) y  $\gamma_{\pm} = 1$ , por lo tanto, son las fracciones que corresponden hipotéticamente a fuerza iónica cero.

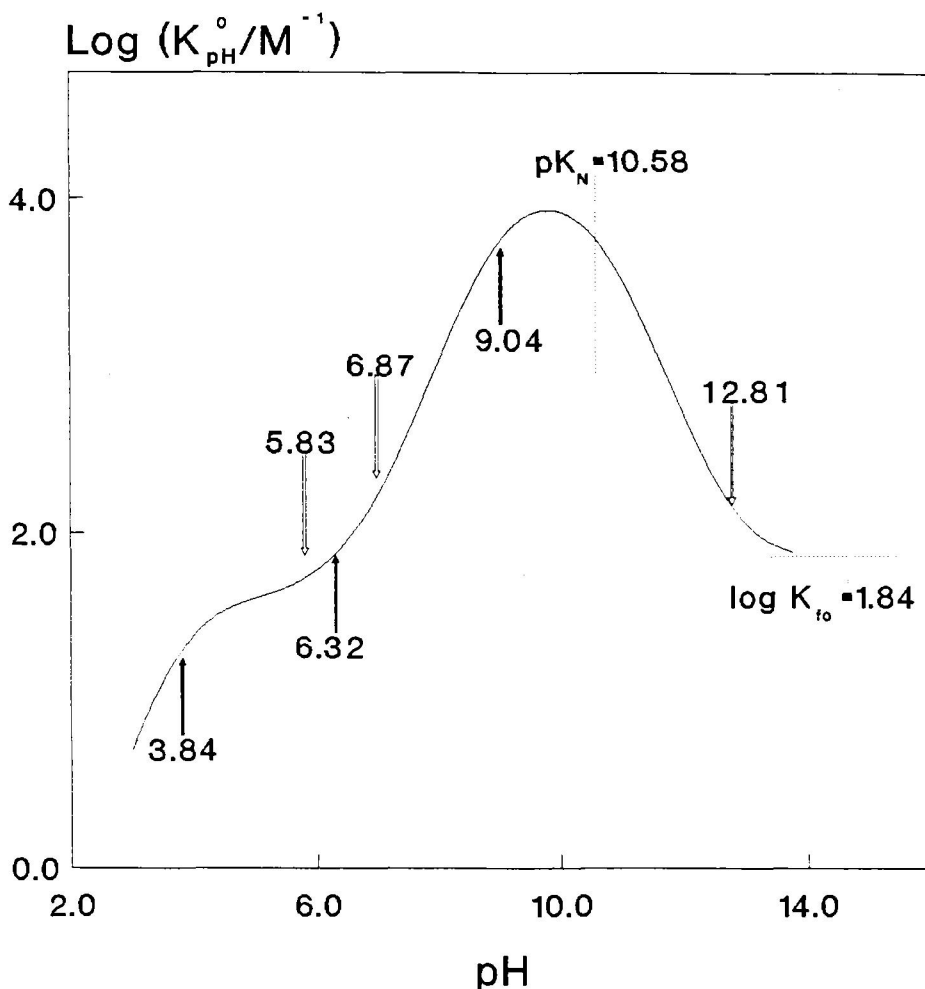


FIGURA 51.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  frente a pH en agua pura a 25 °C.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  se ha calculado con los valores de  $\text{pK}_{\text{ip}}$ ,  $\text{pK}_{\text{ib}}$ ,  $\text{pK}_{\text{2b}}$  y  $\text{pK}_{\text{M}}$  (sección 4. 1. 4., tabla 2) y con  $\text{pK}_{\text{3b}}$  obtenido en esta sección (tabla 3) utilizando  $\gamma_{\pm} = 1$  (ecuación 108), es decir, es la curva que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero. Sobre la curva se han señalado  $\text{pK}_N$ ,  $\text{pK}_{\text{ip}}$  ( $\longrightarrow$ ),  $\text{pK}_{\text{ib}}$  ( $\Longrightarrow$ ) y  $\text{log } K_{f_0}$ .  $\text{Log } K_{f_0}$  se ha calculado utilizando la ecuación 77 y es el valor al que tiende  $\text{log } K_{\text{pH}}^0$  a pH muy básico.

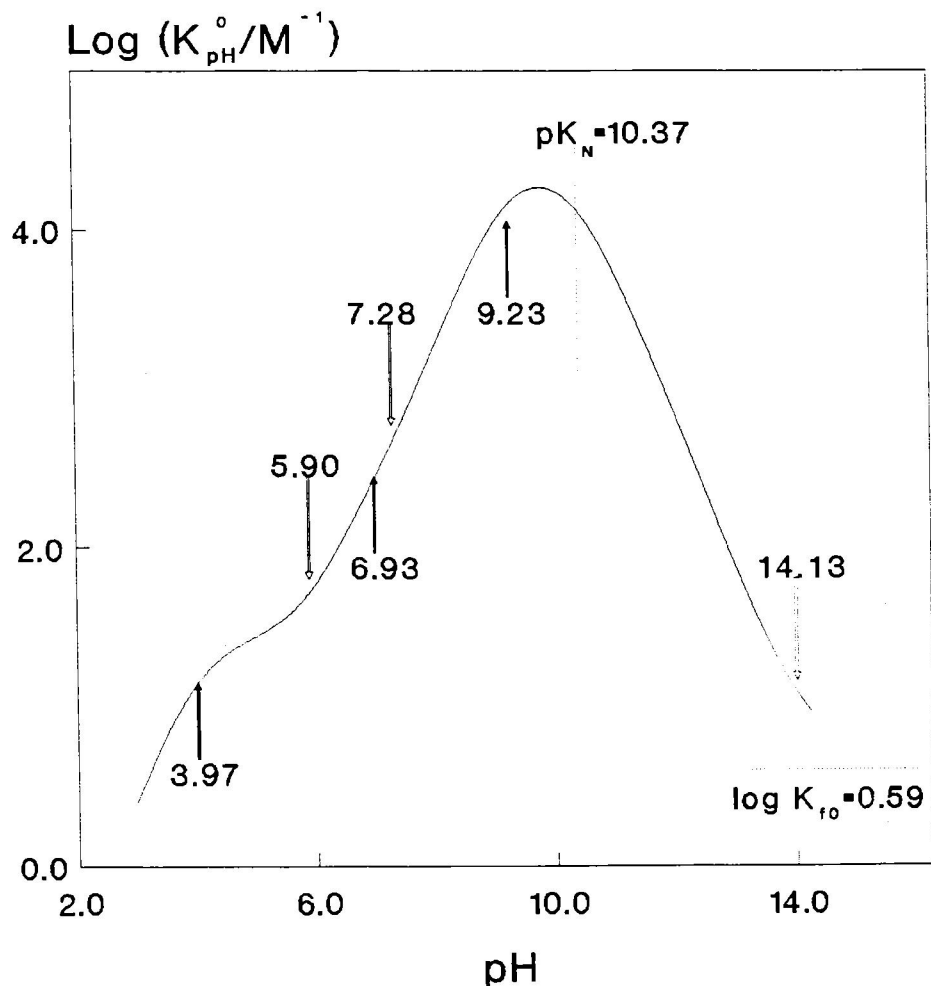


FIGURA 52.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  frente a  $\text{pH}$  en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a  $25^\circ \text{C}$ .  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  se ha calculado con los valores de  $\text{pK}_{\text{ip}}$ ,  $\text{pK}_{\text{ib}}$ ,  $\text{pK}_{\text{2b}}$  y  $\text{pK}_N$  (sección 4. 1. 4., tabla 2) y con  $\text{pK}_{\text{3b}}$  obtenido en esta sección (tabla 3) utilizando  $\gamma_{\pm} = 1$  (ecuación 108), es decir, es la curva que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero. Sobre la curva se han señalado  $\text{pK}_N$ ,  $\text{pK}_{\text{ip}}$  ( $\longrightarrow$ ),  $\text{pK}_{\text{ib}}$  ( $\Longrightarrow$ ) y  $\log K_{f_0}$ .  $\log K_{f_0}$  se ha calculado utilizando la ecuación 77 y es el valor al que tiende  $\log K_{\text{pH}}^0$  a  $\text{pH}$  muy básico.

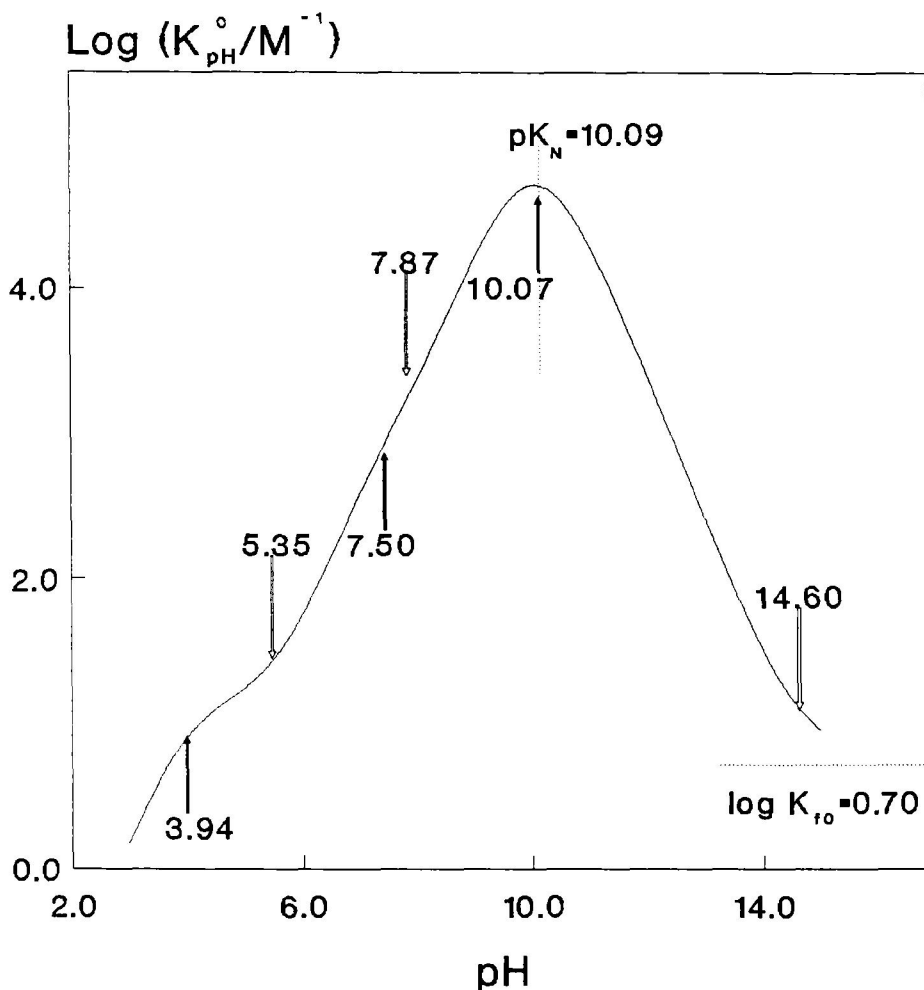


FIGURA 53.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  frente a pH en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  se ha calculado con los valores de  $\text{pK}_{\text{ip}}$ ,  $\text{pK}_{\text{ib}}$ ,  $\text{pK}_{\text{2b}}$  y  $\text{pK}_N$  (sección 4. 1. 4., tabla 2) y con  $\text{pK}_{\text{3b}}$  obtenido en esta sección (tabla 3) utilizando  $\gamma_{\pm} = 1$  (ecuación 108), es decir, es la curva que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero. Sobre la curva se han señalado  $\text{pK}_N$ ,  $\text{pK}_{\text{ip}}$  ( $\longrightarrow$ ),  $\text{pK}_{\text{ib}}$  ( $\Longrightarrow$ ) y  $\text{log } K_{f0}$ .  $\text{Log } K_{f0}$  se ha calculado utilizando la ecuación 77 y es el valor al que tiende  $\text{log } K_{\text{pH}}^0$  a pH muy básico.



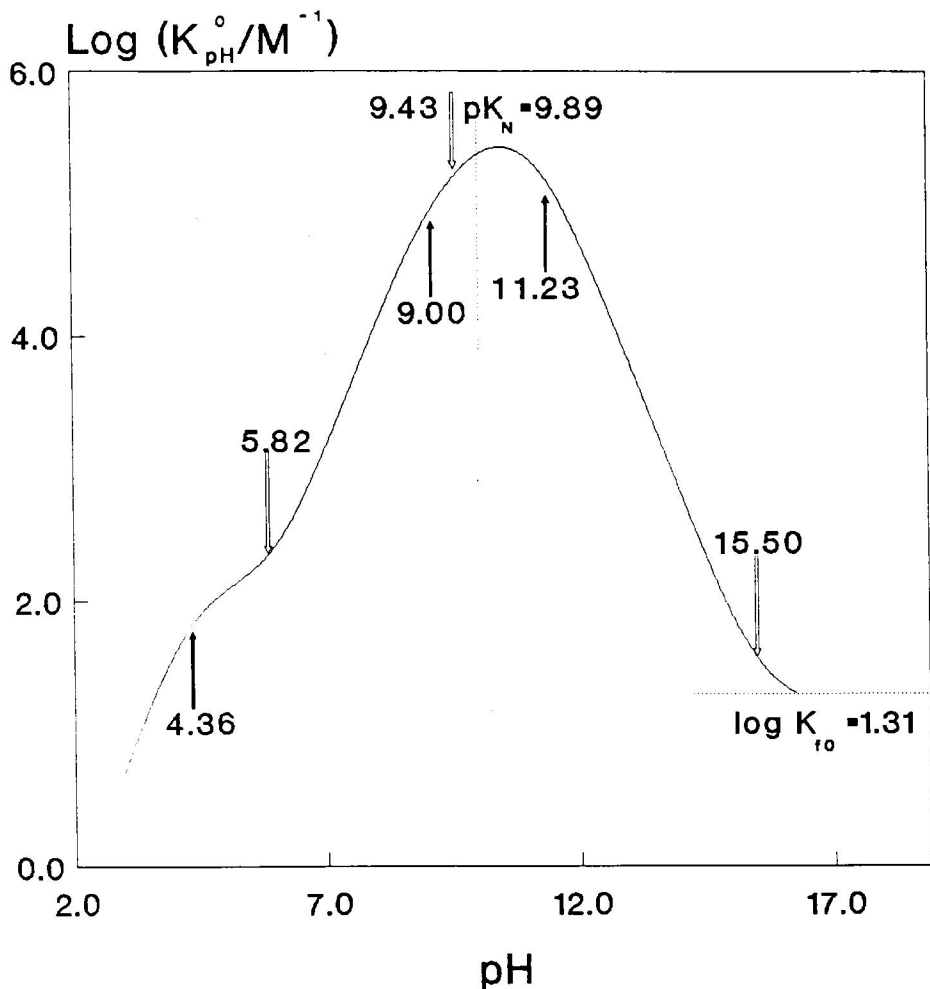


FIGURA 54.  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  frente a  $\text{pH}$  en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a  $25^\circ \text{C}$ .  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  se ha calculado con los valores de  $\text{p}K_{1\text{p}}$ ,  $\text{p}K_{1\text{b}}$ ,  $\text{p}K_{2\text{b}}$  y  $\text{p}K_{\text{N}}$  (sección 4. 1. 4., tabla 2) y con  $\text{p}K_{3\text{b}}$  obtenido en esta sección (tabla 3) utilizando  $\gamma_{\pm} = 1$  (ecuación 108), es decir, es la curva que corresponde hipotéticamente a fuerza iónica igual a cero. Sobre la curva se han señalado  $\text{p}K_{\text{N}}$ ,  $\text{p}K_{1\text{p}}$  ( $\longrightarrow$ ),  $\text{p}K_{1\text{b}}$  ( $\Longrightarrow$ ) y  $\text{log } K_{\text{f}0}$ .  $\text{Log } K_{\text{f}0}$  se ha calculado utilizando la ecuación 77 y es el valor al que tiende  $\text{log } K_{\text{pH}}^0$  a  $\text{pH}$  muy básico.

El desarrollo es totalmente análogo al hecho anteriormente para obtener  $K_{pH}$  en función de las constantes de ionización y de  $K_M$  (ecuación 52), la única diferencia es que aquí tenemos que considerar también la especie  $B_0$  y que  $\gamma_{\pm}$  vale 1. Siguiendo este procedimiento llegamos a que  $K_{pH}^0$  viene dada por:

$$K_{pH}^0 = K_M \cdot K_{3b} \cdot \frac{Z'_b}{Z_a \cdot Z_p} \quad (108)$$

donde  $Z_p$  y  $Z_a$  ya han sido definidos (ecuaciones 18 y 19) y  $Z'_b$  es totalmente equivalente a  $Z_b$  (ecuación 46) incluyendo la especie  $B_0$ :

$$Z'_b = 1 + \frac{a_H}{K_{3b}} + \frac{a_H^2}{K_{2b} \cdot K_{3b}} + \frac{a_H^3}{K_{1b} \cdot K_{2b} \cdot K_{3b}} \quad (109)$$

La ecuación de  $K_{pH}$  obtenida en la sección 4. 1. 1. en función de las constantes de ionización y de  $K_M$  (ecuación 52) era:

$$K_{pH} = K_M \cdot a_H \cdot \frac{Z_b}{Z_p \cdot Z_a} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (52)$$

que, para  $\gamma_{\pm}=1$ , ha de adquirir el mismo valor que la ecuación 103 en el intervalo de pH en que se realizaron las valoraciones potenciométricas, es decir, se ha de cumplir que:

$$a_H \cdot Z_b = K_{3b} \cdot Z'_b$$

Sustituyendo  $Z_b$  (ecuación 46) y  $Z'_b$  (ecuación 109) tenemos:

$$a_H + \frac{a_H^2}{K_{2b}} + \frac{a_H^3}{K_{1b} \cdot K_{2b}} = K_{3b} + a_H + \frac{a_H^2}{K_{2b}} + \frac{a_H^3}{K_{1b} \cdot K_{2b}}$$

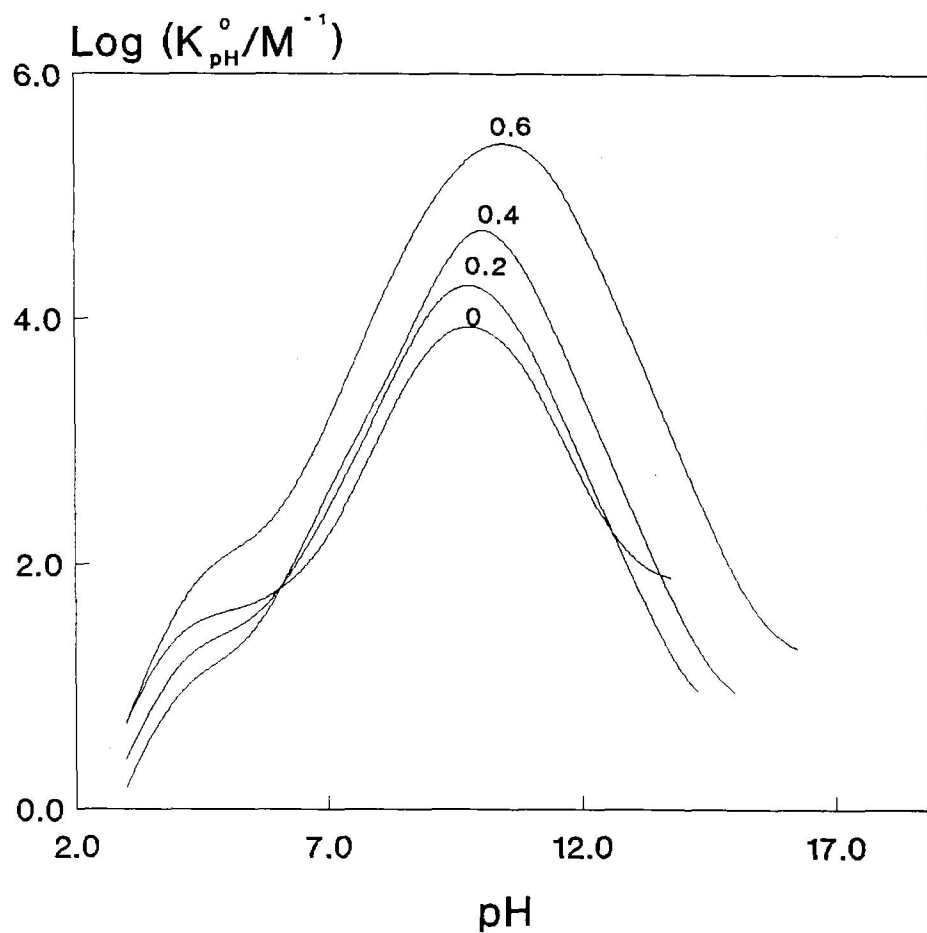
y para el intervalo de pH citado:

$$K_{3b} \ll a_H$$

es decir, la ecuación 52 es un caso particular de la 108 para el intervalo de pH en que  $b_0 \approx 0$ , o sea, cuando estamos a valores de pH mucho menores que aquel al que tiene lugar la ionización entre las especies  $B_1$  y  $B_0$ .

$K_{pH}^0$  se puede considerar como una constante de equilibrio aparente ya que depende del pH y termodinámica ya que se ha calculado a fuerza iónica cero. En las figuras 51-54 se han señalado también los valores de pK de PLP, base de Schiff y n-hexilamina así como  $\log K_{f0}$  (calculada según la ecuación 77) para ilustrar como afectan estas constantes de equilibrio a la forma de la curva.

En la figura 55 se han representado juntas las curvas de  $\log K_{pH}^0$  frente al pH para todas las mezclas. Observamos como a medida que aumenta la proporción de dioxano de la mezcla la constante de equilibrio aparente  $K_{pH}^0$  se incrementa desplazándose el máximo hacia pH más básico (de 9.5 en agua a 10.2 en la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano).



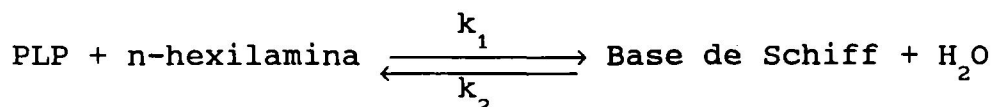
**FIGURA 55.**  $\text{Log } K_{\text{pH}}^0$  frente a  $\text{pH}$  en mezclas agua-dioxano a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Cada una de estas curvas se ha obtenido como se indica en las figuras 51-54. La fracción en volumen de dioxano se muestra sobre cada curva.

5. CINETICA DE FORMACION E HIDROLISIS  
DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO  
DE PIRIDOXAL CON N-HEXILAMINA



## 5. 1. FUNDAMENTO TEORICO.

Hemos estudiado mediante espectrofotometría UV-Visible la cinética de formación e hidrólisis de la base de Schiff formada con el PLP y la n-hexilamina en medio acuoso y en mezclas agua-dioxano:



donde  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes cinéticas aparentes de formación e hidrólisis, respectivamente, que para unas condiciones dadas de temperatura, disolvente y fuerza iónica dependen sólo del pH.

La magnitud física utilizada en este estudio cinético ha sido la absorbancia a una longitud de onda determinada, basándonos en los diferentes espectros que presentan el PLP y la base de Schiff. El espectro UV-visible del PLP es bastante complejo teniendo sus bandas una intensidad y localización que depende de la polaridad del medio y del pH (Matsushima y Martell, 1967; Johnson y Metzler, 1970; Cortijo et al, 1988; Llor et al, 1988;). No obstante, la banda de menor energía en el visible nunca está centrada más allá de los 390 nm. Las bandas de la base de Schiff están desplazadas hacia el rojo apareciendo la primera banda centrada en 415 nm (Johnson y Metzler, 1970; Metzler et al, 1980) donde el PLP absorbe relativamente poco por lo que hemos elegido esta longitud de onda para medir la variación de la absorbancia con el tiempo en

el transcurso de la cinética.

A continuación vamos a deducir la ecuación integrada de velocidad para el caso general en que inicialmente exista en el medio de reacción PLP, n-hexilamina y base de Schiff con unas concentraciones dadas (ecuación 116) ya que, como se describirá más adelante (sección 5. 2.), nuestros experimentos cinéticos se han realizado partiendo de diferentes condiciones iniciales según el intervalo de pH estudiado. Posteriormente obtendremos esta ecuación en términos de absorbancia (ecuación 124).

Hemos supuesto que los dos procesos, formación e hidrólisis, son de segundo orden. En el caso del proceso inverso, puesto que la cantidad de agua está en gran exceso y puede considerarse constante, podemos definir la constante  $k_2$  como de pseudo primer orden introduciendo la concentración de agua en dicha constante. Con objeto de facilitar el análisis de datos, hemos trabajado con un exceso de n-hexilamina (concentración entre 15 y 120 veces mayor que la de PLP) de forma que su concentración también pueda considerarse constante en el transcurso de la reacción (condiciones de pseudo primer orden para la reacción directa). En estas condiciones la velocidad de la reacción viene dada por:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot (c_{p0} - x) \cdot c_{a0} - k_2 \cdot (c_{b0} + x) \quad (110)$$

donde  $c_{p0}$  y  $c_{b0}$  son las concentraciones iniciales de PLP y base de Schiff, respectivamente.  $(c_{p0} - x)$  y  $(c_{b0} + x)$  representan las concentraciones de PLP y base de Schiff, respectivamente, en un tiempo  $t$ .  $c_{a0}$  es la concentración de n-hexilamina en cualquier



instante de la cinética que se supone constante en nuestras condiciones experimentales, como hemos indicado.

La constante de equilibrio aparente,  $K_{pH}$ , será:

$$K_{pH} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{c_{b0} + x_e}{(c_{p0} - x_e) \cdot c_{a0}} \quad (111)$$

siendo  $(c_{b0} + x_e)$  y  $(c_{p0} - x_e)$  las concentraciones de PLP y base de Schiff, respectivamente, en el equilibrio.

Despejando  $k_2$  en la ecuación 111 y sustituyendo en 110 tenemos:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{k_1 \cdot c_{a0} \cdot (c_{b0} + c_{p0})}{c_{b0} + x_e} \cdot (x_e - x) \quad (112)$$

De esta manera la ecuación diferencial es ya fácilmente integrable:

$$\int_0^x \frac{dx}{x_e - x} = \frac{k_1 \cdot c_{a0} \cdot (c_{b0} + c_{p0})}{c_{b0} + x_e} \cdot \int_0^t dt \quad (113)$$

y se obtiene como resultado:

$$\ln \frac{x_e}{x_e - x} = \frac{k_1 \cdot c_{a0} \cdot (c_{b0} + c_{p0})}{c_{b0} + x_e} \cdot t \quad (114)$$

En la ecuación 111 podemos despejar  $x_e$ :

$$x_e = \frac{k_1 \cdot c_{p0} \cdot c_{a0} - k_2 \cdot c_{b0}}{k_2 + k_1 \cdot c_{a0}} \quad (115)$$

y sustituyendo en la ecuación 114 tenemos:

$$\ln \frac{x_e}{x_e - x} = (k_2 + k_1 \cdot c_{a0}) \cdot t \quad (116)$$

Esta ecuación nos da la variación con el tiempo de las concentraciones de los distintos compuestos de la reacción en condiciones de pseudo primer orden para ambos procesos (directo e inverso). Podemos definir una constante aparente de velocidad de primer orden,  $k_{ap}$ , como:

$$k_{ap} = k_2 + k_1 \cdot c_{a0} \quad (117)$$

Esta constante aparente de velocidad depende de la concentración de n-hexilamina inicial (reactivo que hemos puesto en exceso) y del pH (y, por supuesto, de la fuerza iónica, del disolvente y de la temperatura).

Como ya hemos indicado la magnitud física que hemos medido ha sido la absorbancia, relacionada con la concentración de la sustancia que absorbe radiación a la longitud de onda considerada mediante la ley de Lambert-Beer (sección 4. 2. 1., ecuación 92). Hemos utilizado células de paso de luz de 1 cm por lo cual a partir de ahora omitiremos el espesor de muestra atravesado por la luz,  $l$ , en las ecuaciones de la absorbancia. En nuestro caso

existen dos sustancias que absorben, el PLP y la base de Schiff, por lo que la absorbancia vendrá dada por:

$$A_0 = \epsilon_p \cdot c_{p0} + \epsilon_b \cdot c_{b0} \quad (118)$$

$$A = \epsilon_p \cdot (c_{p0} - x) + \epsilon_b \cdot (c_{b0} + x) \quad (119)$$

$$A_\infty = \epsilon_p \cdot (c_{p0} - x_e) + \epsilon_b \cdot (c_{b0} + x_e) \quad (120)$$

donde  $A_0$ ,  $A$  y  $A_\infty$  son las absorbancias en el instante inicial,  $t=0$ , en un tiempo  $t$  y en el equilibrio, respectivamente.  $\epsilon_p$  y  $\epsilon_b$  son los coeficientes de extinción molar del PLP y de la base de Schiff (en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).

Operando en estas ecuaciones tenemos que:

$$x = \frac{A - A_0}{\epsilon_b - \epsilon_p} \quad (121)$$

$$x_e = \frac{A_\infty - A_0}{\epsilon_b - \epsilon_p} \quad (122)$$

y sustituyendo en la ecuación 116:

$$\ln \frac{A_\infty - A_0}{A_\infty - A} = k_{ap} \cdot t \quad (123)$$

ecuación que en su forma exponencial viene dada por:

$$A = A_{\infty} + (A_0 - A_{\infty}) \cdot \exp(-k_{ap} \cdot t) \quad (124)$$

Esta ecuación nos permite obtener  $k_{ap}$  mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos experimentales de absorbancia y tiempo.

Una vez conocida  $k_{ap}$  para una concentración de amina dada,  $c_{a0}$ , el método habitualmente seguido es estudios semejantes (Auld y Bruice, 1967; Sánchez-Ruiz et al, 1982; Llor et al, 1984 y 1989) es realizar varias cinéticas a exactamente el mismo pH y a distinta  $c_{a0}$  con objeto de, mediante una regresión lineal, obtener  $k_1$  y  $k_2$  (ecuación 117). Por supuesto, este procedimiento se repite a diferentes valores de pH a fin de obtener los correspondientes perfiles de  $k_1$  y  $k_2$  versus pH. Nótese que este método requiere tamponar muy bien el medio para conseguir una buena reproducibilidad en los valores de pH; en nuestro caso (medidas en mezclas agua-dioxano) , sin embargo, el utilizar tampones originaría varios inconvenientes:

1. Las constantes de ionización de los tampones varían con la polaridad del disolvente, por lo cual tendríamos que hacer un estudio previo para determinar cuales son los tampones más adecuados en cada mezcla agua-dioxano.

2. Sería necesario analizar, para cada tampón y mezcla agua-dioxano, si existe catálisis ácido-base general por los tampones, con el elevado número de medidas adicionales que esto supone (en cada condición concreta sería necesario llevar a cabo experimentos a diferente concentración de tampón).

3. La fuerza iónica sería demasiado elevada lo que aumentaría

la probabilidad de asociaciones iónicas en mezclas ricas en dioxano.

Por estas razones no hemos utilizado tampones en nuestros experimentos. Hemos empleado HCl y KOH para ajustar el pH manteniendo la fuerza iónica total a 0.01 añadiendo la cantidad necesaria de KCl (sección 5. 2.). El no utilizar tampones no impide la determinación del pH en cada cinética concreta, pero sí hace difícil, sin embargo, obtener series de valores de  $k_{ap}$  a diferente concentración de n-hexilamina y a exactamente el mismo pH; por lo tanto no podemos obtener  $k_1$  y  $k_2$  a partir de un ajuste lineal de mínimos cuadrados de la ecuación 117 a valores de  $k_{ap}$  en función de  $c_{a0}$  obtenidos al mismo pH. No obstante podemos calcular  $k_1$  y  $k_2$  a un pH dado ya que conocemos las constantes de equilibrio de ionización y de formación determinadas previamente (sección 4. 1. 4., tabla 2) y por lo tanto  $K_{pH}$  (ecuación 52).

Hemos obtenido perfiles de  $k_{ap}$  en función del pH para tres concentraciones de n-hexilamina en cada mezcla agua-dioxano (figuras 60-63). Para cada valor de  $k_{ap}$  hemos calculado  $k_1$  y  $k_2$  utilizando las ecuaciones 111 y 117 de donde se deducen  $k_1$  y  $k_2$  como:

$$k_2 = \frac{k_{ap}}{1 + K_{pH} \cdot c_{a0}} \quad (125)$$

$$k_1 = K_{pH} \cdot k_2 \quad (126)$$

siendo  $K_{pH}$  (ecuación 52):

$$K_{pH} = \frac{k_1}{k_2} = K_H \cdot a_H \cdot \frac{Z_b}{Z_p \cdot Z_a} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (52)$$

El valor de  $\gamma_{\pm}$  utilizado ha sido el correspondiente a fuerza iónica 0.01 ya que es al que se han realizado los experimentos cinéticos (sección 5. 2.).

Para comprobar la validez de este procedimiento de cálculo hemos realizado tres series de cinéticas a distinta concentración de amina y hemos comprobado que los perfiles de  $k_1$  y  $k_2$  en función del pH coinciden entre sí (figuras 64-68).

## 5. 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Hemos estudiado la cinética de formación e hidrólisis de la base de Schiff formada entre PLP y n-hexilamina midiendo la variación de la absorbancia a 415 nm con el tiempo. Para que el error en la determinación de las constantes de velocidad sea mínimo es necesario que la variación total de absorbancia en una cinética dada no sea excesivamente pequeña. A valores ácidos de pH la constante de equilibrio aparente,  $K_{pH}$ , es baja (ver figura 38), es decir, el equilibrio está poco desplazado hacia la formación de la base de Schiff; por esta razón la variación total de absorbancia, si realizamos las cinéticas partiendo de una mezcla de PLP y amina, es bastante pequeña. Para evitar este problema hemos realizado los experimentos con condiciones iniciales diferentes según el intervalo de pH considerado:

1.  $pH > 6.5$ . Se preparaba una disolución de n-hexilamina al pH adecuado. La cinética se iniciaba añadiendo a 2 mls de esta disolución 100  $\mu$ l de otra de PLP de concentración  $8 \cdot 10^{-5}$  M preparada aproximadamente al mismo pH que la disolución de amina. Con estas condiciones iniciales la absorbancia va aumentando en función del tiempo ya que lo que estamos observando es la formación de la base de Schiff (figuras 56 y 58).

2.  $pH < 6.5$ . Se preparaba una disolución de n-hexilamina al pH adecuado. La cinética se iniciaba añadiendo a 2 mls de esta

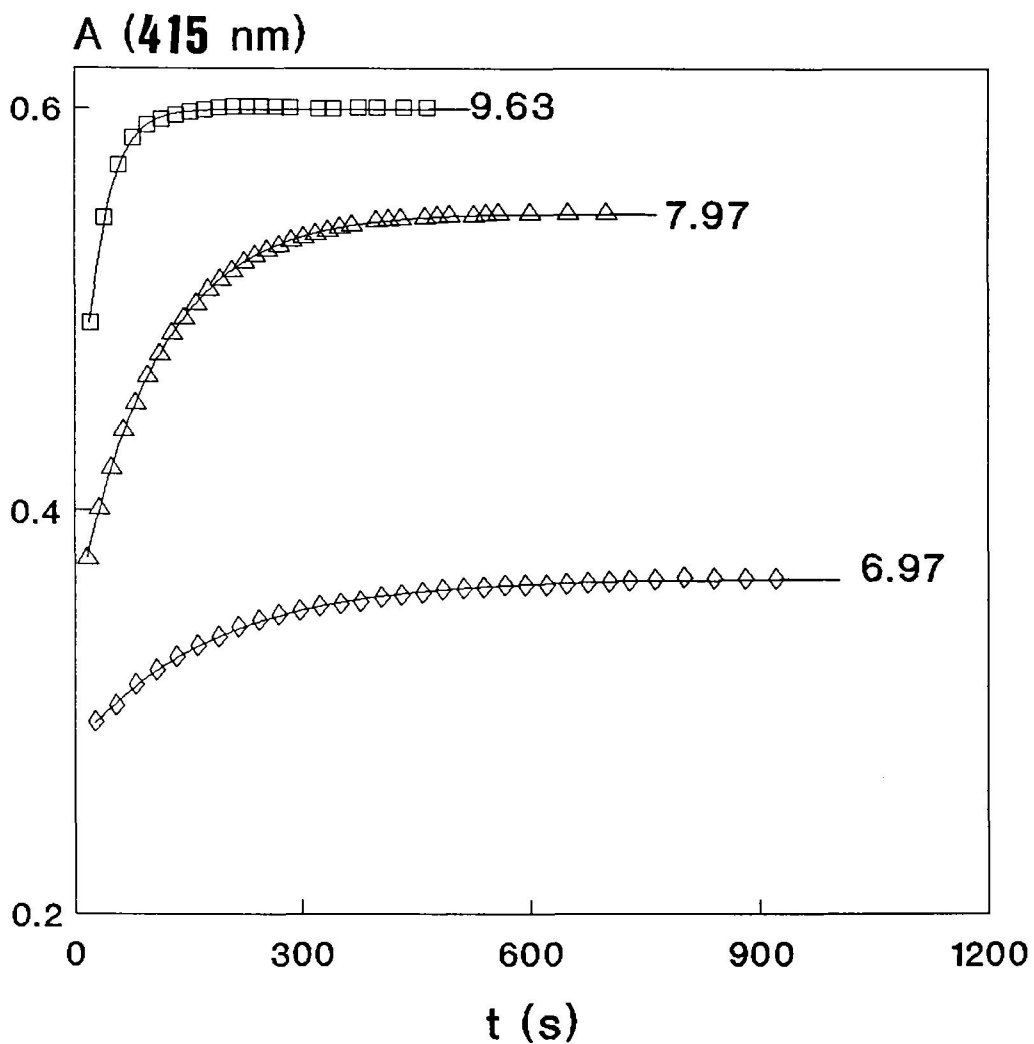
disolución 100  $\mu\text{l}$  de otra de PLP y n-hexilamina de la misma concentración (aproximadamente  $8.10^{-5}$  M) preparada al pH al cual la constante de equilibrio aparente es máxima (9.5 para agua y 10.2 para la mezcla con un 0.6 de fracción en volumen de dioxano, ver figura 38). En este caso la absorbancia disminuye con el tiempo ya que lo que estamos observando es la hidrólisis de la base de Schiff (figuras 57 y 59).

Las reacciones se han llevado a cabo en la propia célula espectrofotométrica termostaticada a  $25 \pm 0.1$  °C comprobando antes de realizar la experiencia con el sensor de resistencia de platino (sección 2.) que se había alcanzado esta temperatura y que era estable.

Trás la adición de los 100  $\mu\text{l}$  (de PLP o de PLP+n-hexilamina, según el pH) se ponía en marcha el sistema de adquisición de datos. Se agitaba, se cerraba el compartimento de la célula y se comenzaban a grabar los valores de absorbancia. De esta manera se perdían de 10 a 15 segundos pero no se cometían errores apreciables en la medida del tiempo. La adquisición de datos se mantenía hasta que la reacción alcanzaba el equilibrio.

Los experimentos se realizaron a tres concentraciones totales de n-hexilamina distintas: 0.001 M, 0.0025 M y 0.0095 M. Las disoluciones de amina al pH adecuado se prepararon mezclando disoluciones de n-hexilamina con distinta concentración de KOH o HCl. Todas las disoluciones utilizadas se prepararon en la mezcla agua-dioxano correspondiente manteniendo en todos los experimentos fuerza iónica 0.01 añadiendo la concentración de ClK necesaria en cada caso para conseguir este valor.





**FIGURA 56.** Absorbancia a 415 nm frente a tiempo, para experimentos cinéticos, en agua pura a 25 °C. La cinética se iniciaba añadiendo a una disolución de n-hexilamina (2 mls), 100  $\mu$ l de PLP  $8 \times 10^{-5}$  M. (—) curva teórica predicha por la ecuación 124 y los valores óptimos de  $k_{ap}$ . La concentración total de n-hexilamina es 0.0025 M. El pH se indica sobre cada curva.

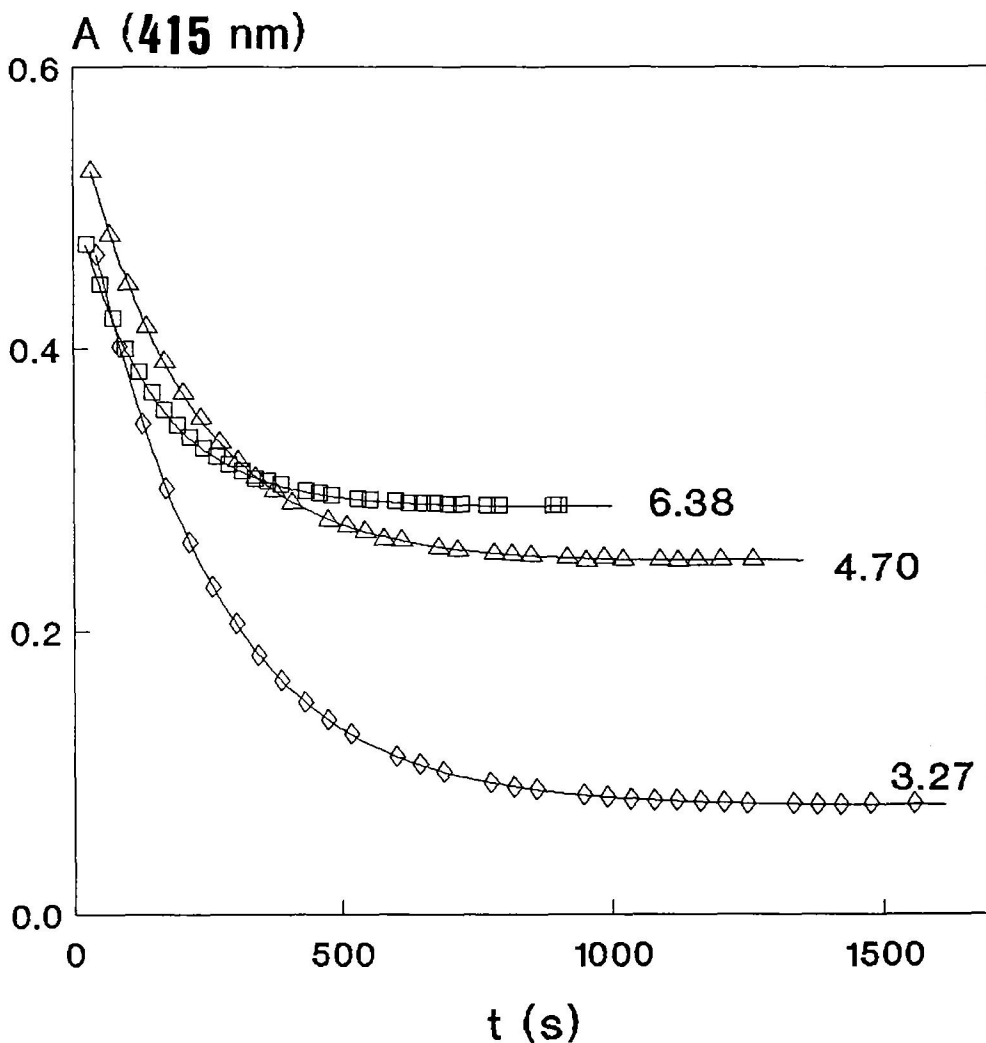


FIGURA 57. Absorbancia a 415 nm frente a tiempo, para experimentos cinéticos, en agua pura a 25 °C. La cinética se iniciaba añadiendo a una disolución de n-hexilamina (2 mls), 100  $\mu$ l de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio a pH 9.5 (concentración de PLP + base de Schiff =  $8 \times 10^{-5}$  M). (—) curva predicha por la ecuación 124 y los valores óptimos de  $k_{ap}$ . La concentración total de n-hexilamina es 0.001 M. El pH se indica sobre cada curva.

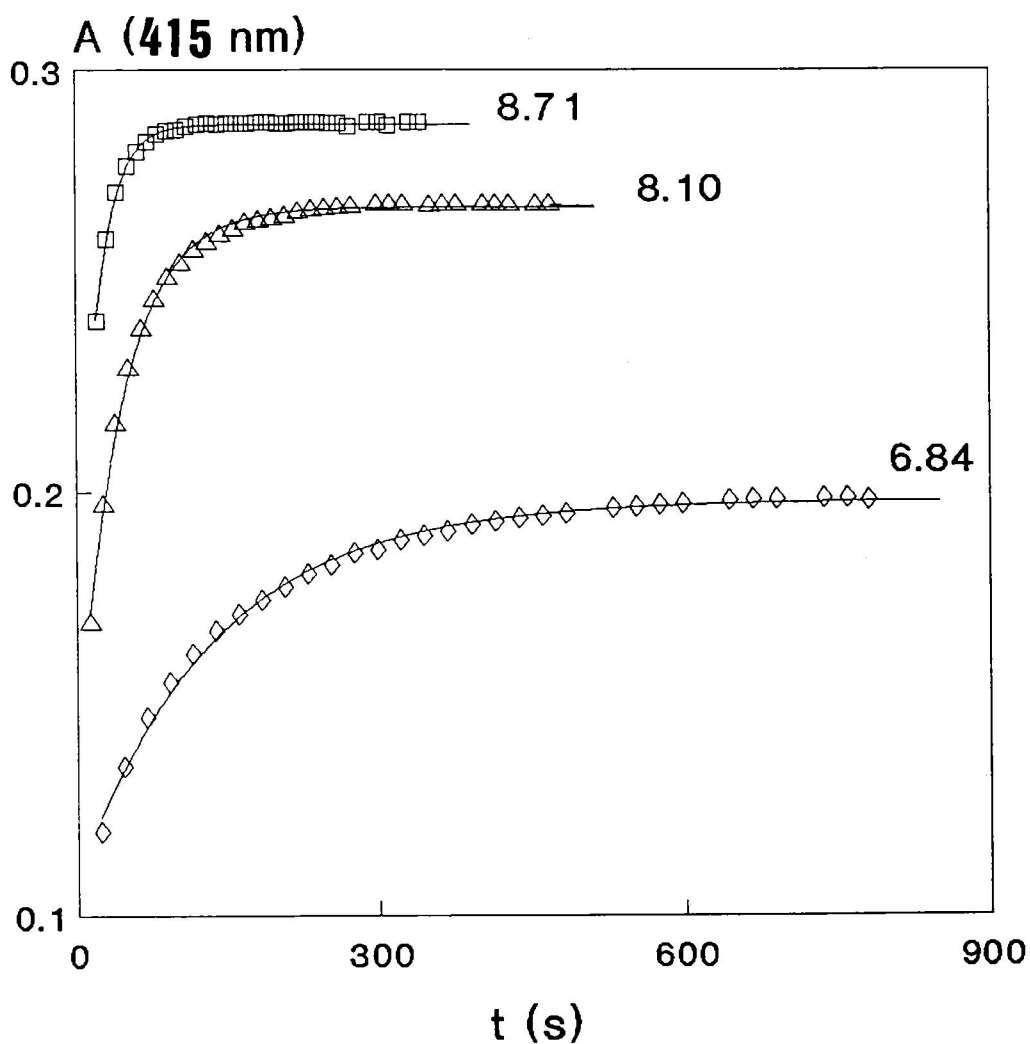


FIGURA 58. Absorbancia a 415 nm frente a tiempo, para experimentos cinéticos, en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. La cinética se iniciaba añadiendo a una disolución de n-hexilamina (2 mls), 100  $\mu$ l de PLP  $8 \times 10^{-5}$  M. (—) curva predicha por la ecuación 124 y los valores óptimos de  $k_{ap}$ . La concentración total de n-hexilamina es 0.0025 M. El pH se indica sobre cada curva.

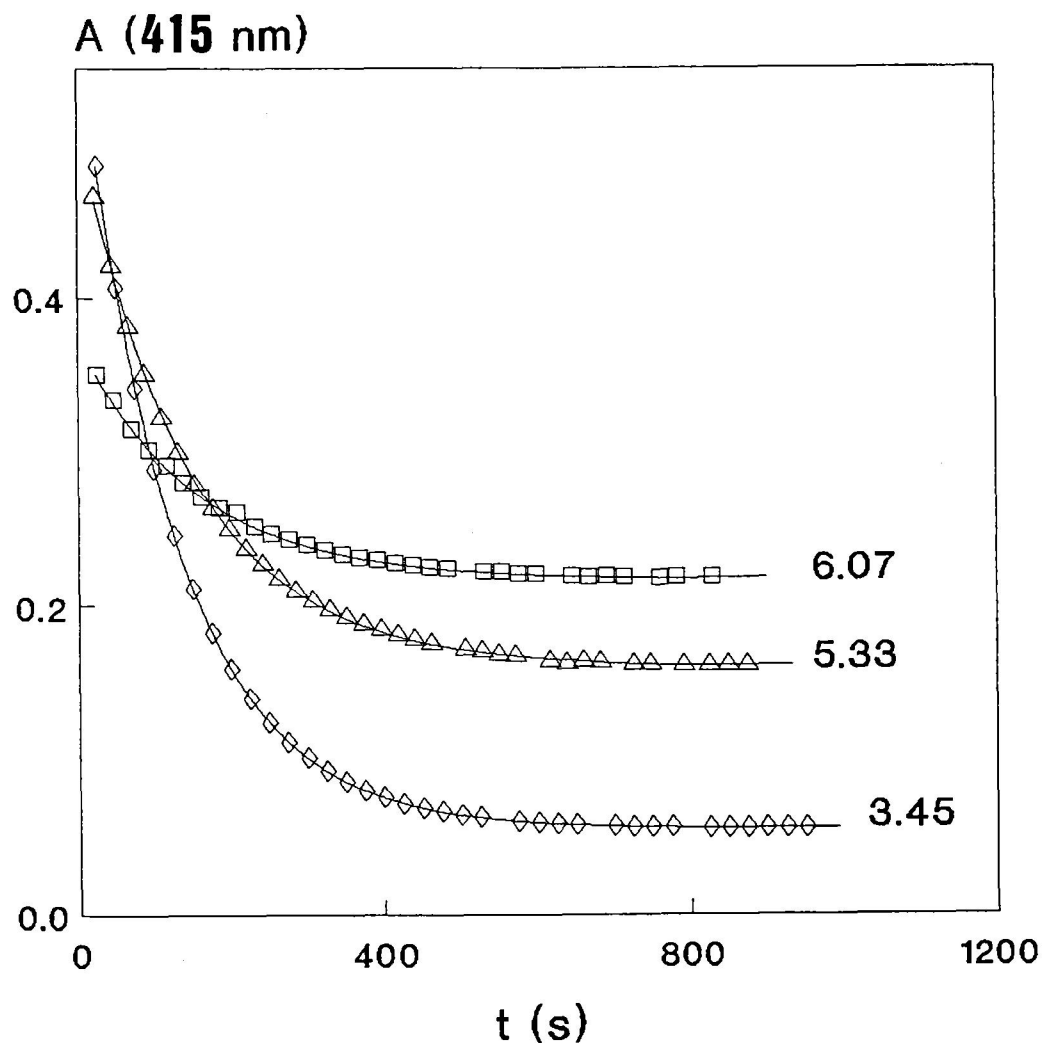


FIGURA 59. Absorbancia a 415 nm frente a tiempo, para experimentos cinéticos, en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. La cinética se iniciaba añadiendo a una disolución de n-hexilamina (2 mls), 100  $\mu$ l de PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio a pH 10.2 (concentración de PLP + base de Schiff =  $8 \times 10^{-5}$  M). (—) curva predicha por la ecuación 124 y los valores óptimos de  $k_{ap}$ . La concentración total de n-hexilamina es 0.0025 M. El pH se indica sobre cada curva.

Se hicieron diversas pruebas, en todas las mezclas estudiadas, siguiendo las cinéticas con el espectrofotómetro y con el pH-metro comprobando que el pH no variaba en el transcurso de la cinética. El pH de cada cinética se medía cuando la reacción alcanzaba el equilibrio (valor de absorbancia constante durante cinco a diez minutos).

### 5. 3. ANALISIS DE DATOS Y RESULTADOS.

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5. 1. hemos obtenido, a partir de los datos experimentales de absorbancia y tiempo, la constante aparente de velocidad,  $k_{ap}$ , en función del pH para cada una de las concentraciones de amina estudiadas, en agua pura y en las mezclas agua-dioxano con un 0.2, 0.4 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano (figuras 60-63). En estas figuras observamos como, para un valor de pH dado, al aumentar  $c_{a0}$  y la proporción de dioxano del disolvente  $k_{ap}$  también aumenta. Los tiempos de vida media más pequeños medidos son del orden de 20 segundos aproximadamente, es decir, valores de  $k_{ap}$  de  $3 \text{ min}^{-1}$  ( $\log(k_{ap}/\text{min}^{-1}) \approx 0.5$ ) (figuras 60-63).

A partir de los valores de  $k_{ap}$  hemos calculado  $k_1$  y  $k_2$  para cada pH (ecuaciones 126 y 125) calculando previamente  $K_{pH}$  (ecuación 52) con las constantes de equilibrio determinadas en la sección 4. 1. 4. (tabla 2) y considerando el valor de  $\gamma_{\pm}$  para fuerza iónica 0.01. De esta forma hemos conseguido tres series de datos, iguales dentro del error experimental, de  $k_1$  y  $k_2$  en función del pH para cada una de las mezclas agua-dioxano estudiadas (figuras 64-67). La coincidencia entre las constantes  $k_1$  y  $k_2$  calculadas a partir de valores de  $k_{ap}$  obtenidos a distinta concentración de amina apoya la corrección de: 1) el procedimiento utilizado para determinar  $k_1$  y  $k_2$ ; 2) las constantes

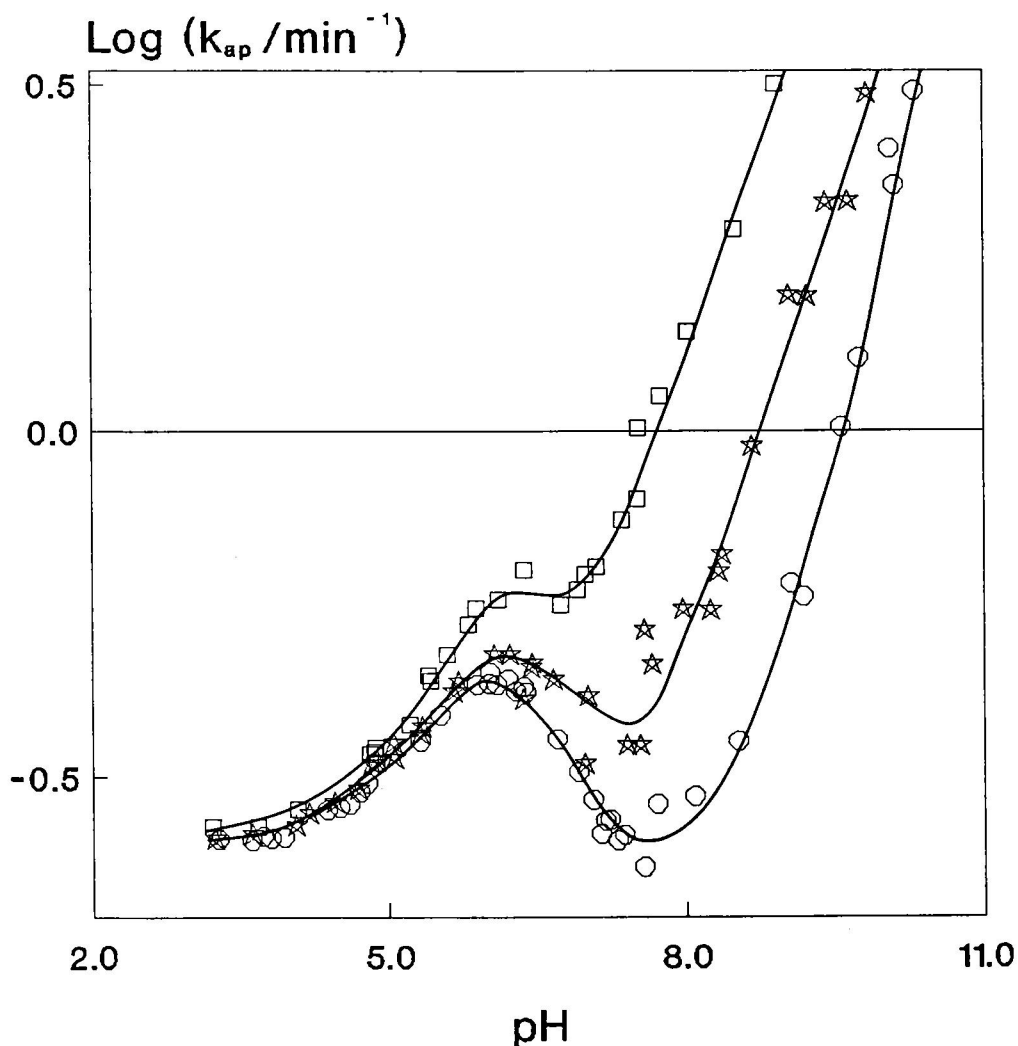


FIGURA 60. Efecto del pH sobre la constante aparente de pseudo primer orden para la formación de la base de Schiff de PLP y n-hexilamina en agua pura a 25 °C. Los valores de  $k_{ap}$  se han obtenido de los ajustes de la ecuación 124 a los datos experimentales de absorbancia y tiempo a cada pH para cada concentración de n-hexilamina total (figuras 56-59). Las concentraciones totales de n-hexilamina son: o = 0.001 M, ☆ = 0.0025 M y □ = 0.0095 M.

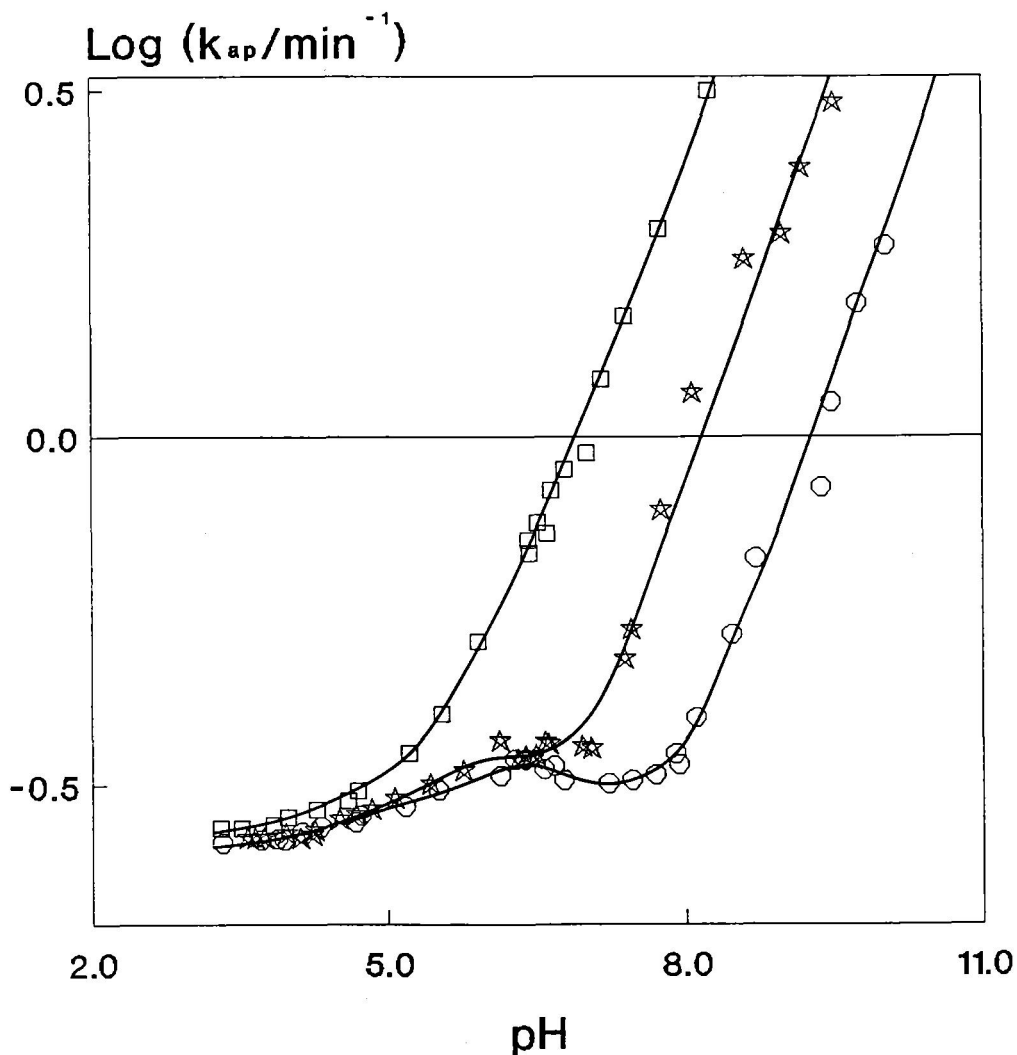
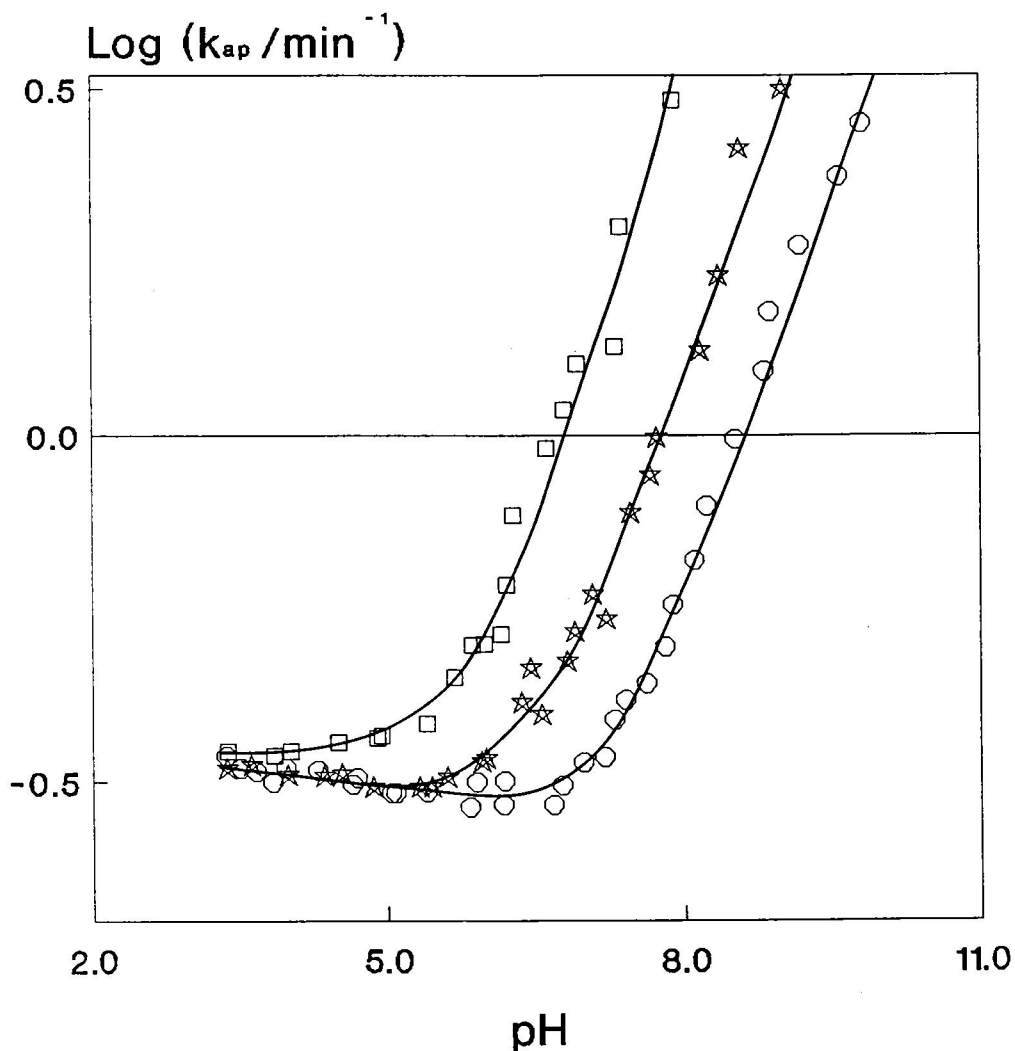
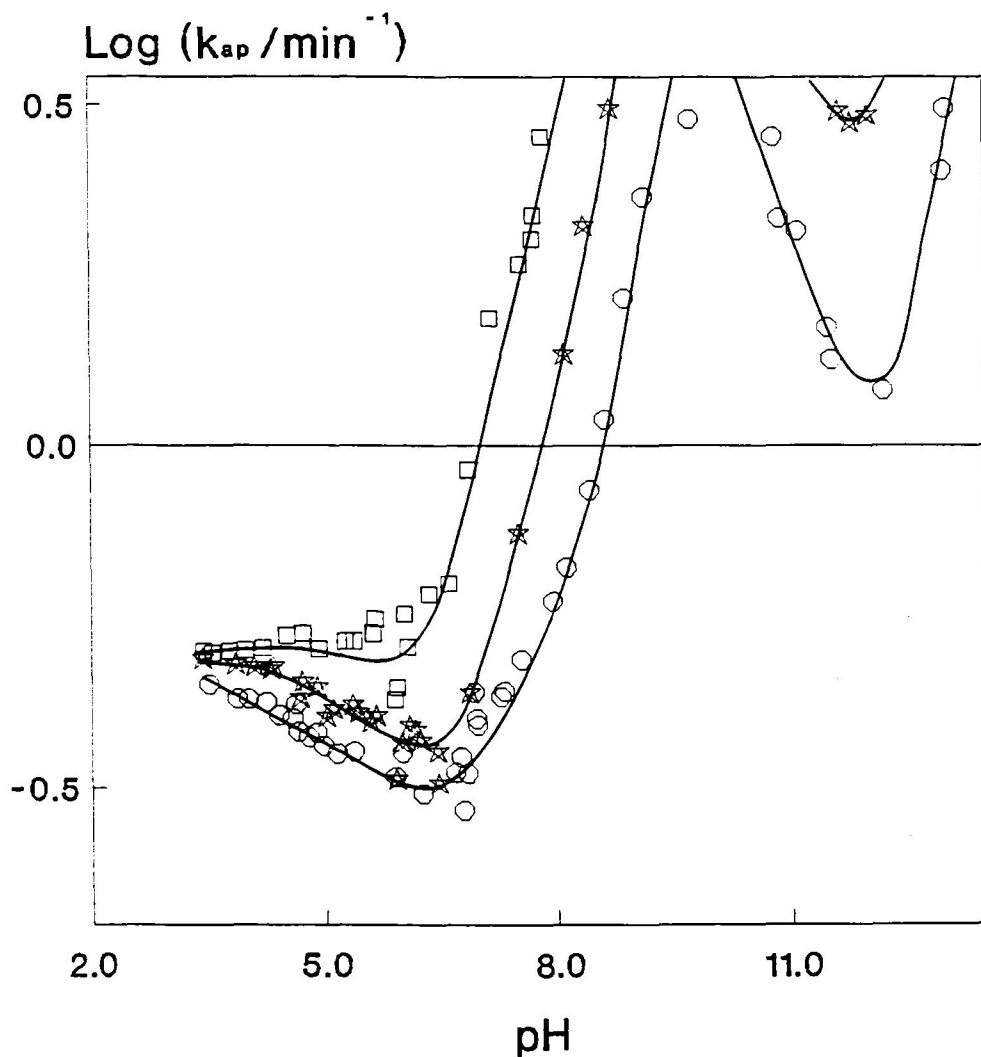


FIGURA 61. Efecto del pH sobre la constante aparente de pseudo primer orden para la formación de la base de Schiff de PLP y n-hexilamina en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Los valores de  $k_{ap}$  se han obtenido de los ajustes de la ecuación 124 a los datos experimentales de absorbancia y tiempo a cada pH para cada concentración de n-hexilamina total (figuras 56-59). Las concentraciones totales de n-hexilamina son:  $\circ = 0.001$  M,  $\star = 0.0025$  M y  $\square = 0.0095$  M.





**FIGURA 62.** Efecto del pH sobre la constante aparente de pseudo primer orden para la formación de la base de Schiff de PLP y n-hexilamina en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Los valores de  $k_{ap}$  se han obtenido de los ajustes de la ecuación 124 a los datos experimentales de absorbancia y tiempo a cada pH para cada concentración de n-hexilamina total (figuras 56-59). Las concentraciones totales de n-hexilamina son:  $\circ = 0.001 \text{ M}$ ,  $\star = 0.0025 \text{ M}$  y  $\square = 0.0095 \text{ M}$ .



**FIGURA 63.** Efecto del pH sobre la constante aparente de pseudo primer orden para la formación de la base de Schiff de PLP y n-hexilamina en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Los valores de  $k_{ap}$  se han obtenido de los ajustes de la ecuación 124 a los datos experimentales de absorbancia y tiempo a cada pH para cada concentración de n-hexilamina total (figuras 56-59). Las concentraciones totales de n-hexilamina son:  $\circ = 0.001 \text{ M}$ ,  $\star = 0.0025 \text{ M}$  y  $\square = 0.0095 \text{ M}$ .

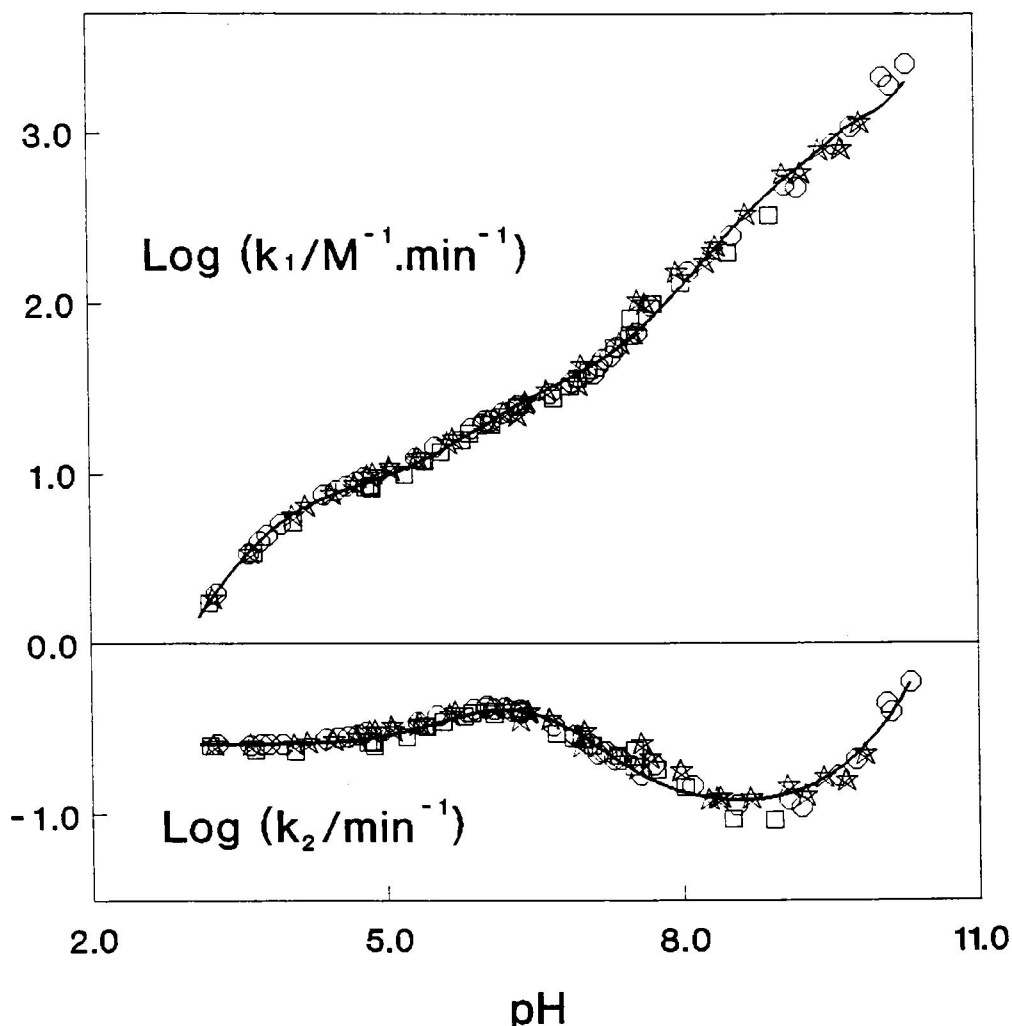


FIGURA 64. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas de formación e hidrólisis,  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, en agua pura a 25 °C. ( — ) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 para  $k_1$  y  $k_2$  respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas en los ajustes (tabla 4). Los símbolos representan los valores de  $k_1$  y  $k_2$  obtenidos a partir de los valores de  $k_{ap}$  dados en la figura 60, usando las ecuaciones 126 y 125, respectivamente. Los distintos tipos de símbolo se refieren a las concentraciones de n-hexilamina correspondientes a los valores de  $k_{ap}$  usados en el cálculo de  $k_1$  y  $k_2$ . Las concentraciones totales de n-hexilamina son:  $\circ = 0.001$  M,  $\star = 0.0025$  M y  $\square = 0.0095$  M.

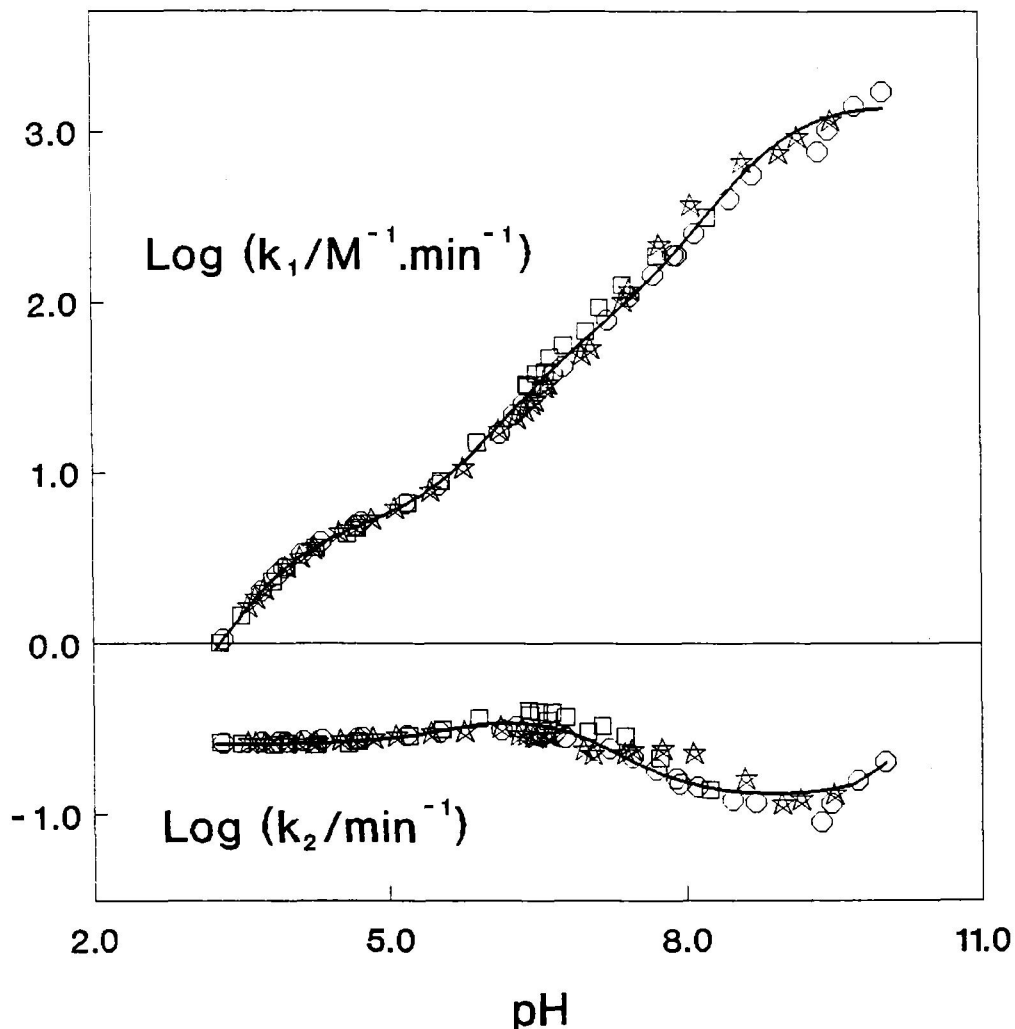


FIGURA 65. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas de formación e hidrólisis,  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 para  $k_1$  y  $k_2$  respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas en los ajustes (tabla 4). Los símbolos representan los valores de  $k_1$  y  $k_2$  obtenidos a partir de los valores de  $k_{ap}$  dados en la figura 61, usando las ecuaciones 126 y 125, respectivamente. Los distintos tipos de símbolo se refieren a las concentraciones de n-hexilamina correspondientes a los valores de  $k_{ap}$  usados en el cálculo de  $k_1$  y  $k_2$ . Las concentraciones totales de n-hexilamina son: o = 0.001 M, ☆ = 0.0025 M y □ = 0.0095 M.

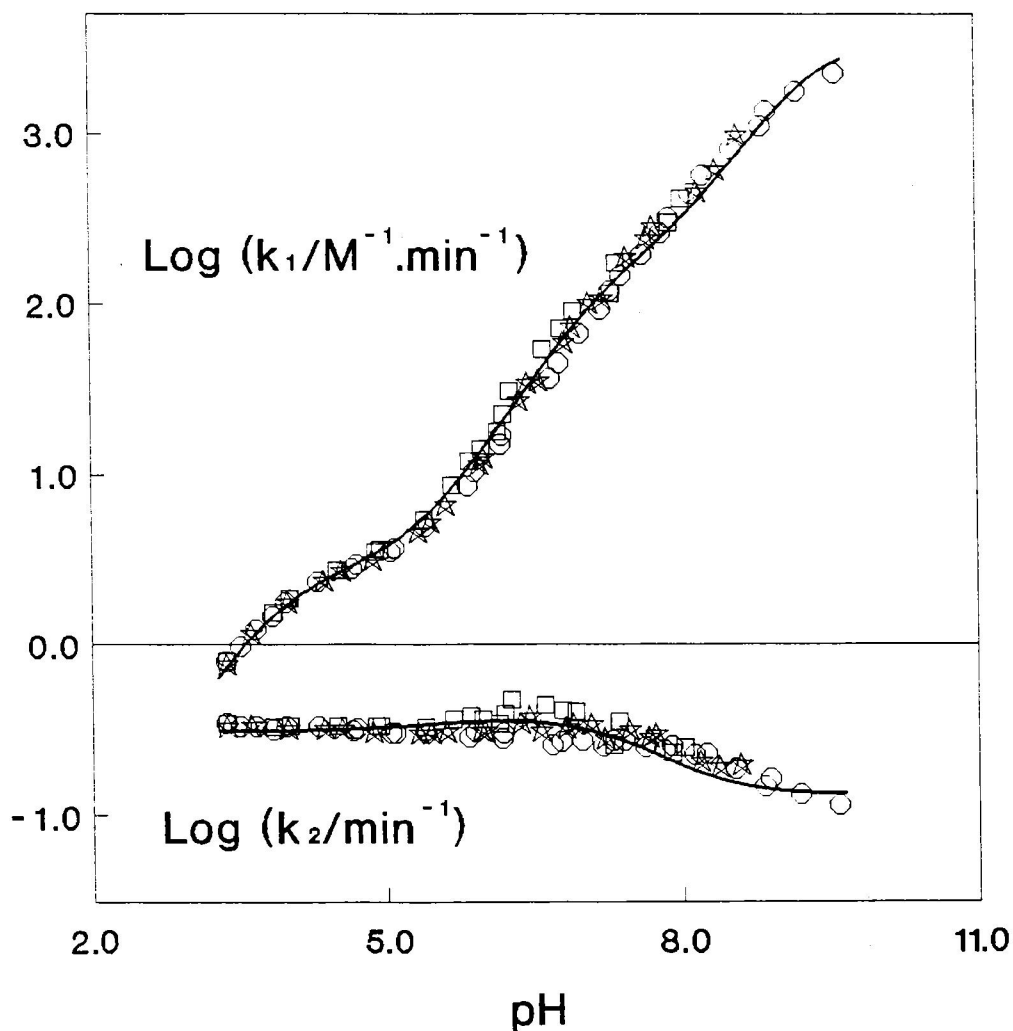


FIGURA 66. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas de formación e hidrólisis,  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 para  $k_1$  y  $k_2$  respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas en los ajustes (tabla 4). Los símbolos representan los valores de  $k_1$  y  $k_2$  obtenidos a partir de los valores de  $k_{ap}$  dados en la figura 62, usando las ecuaciones 126 y 125, respectivamente. Los distintos tipos de símbolo se refieren a las concentraciones de n-hexilamina correspondientes a los valores de  $k_{ap}$  usados en el cálculo de  $k_1$  y  $k_2$ . Las concentraciones totales de n-hexilamina son: o = 0.001 M, ☆ = 0.0025 M y □ = 0.0095 M.

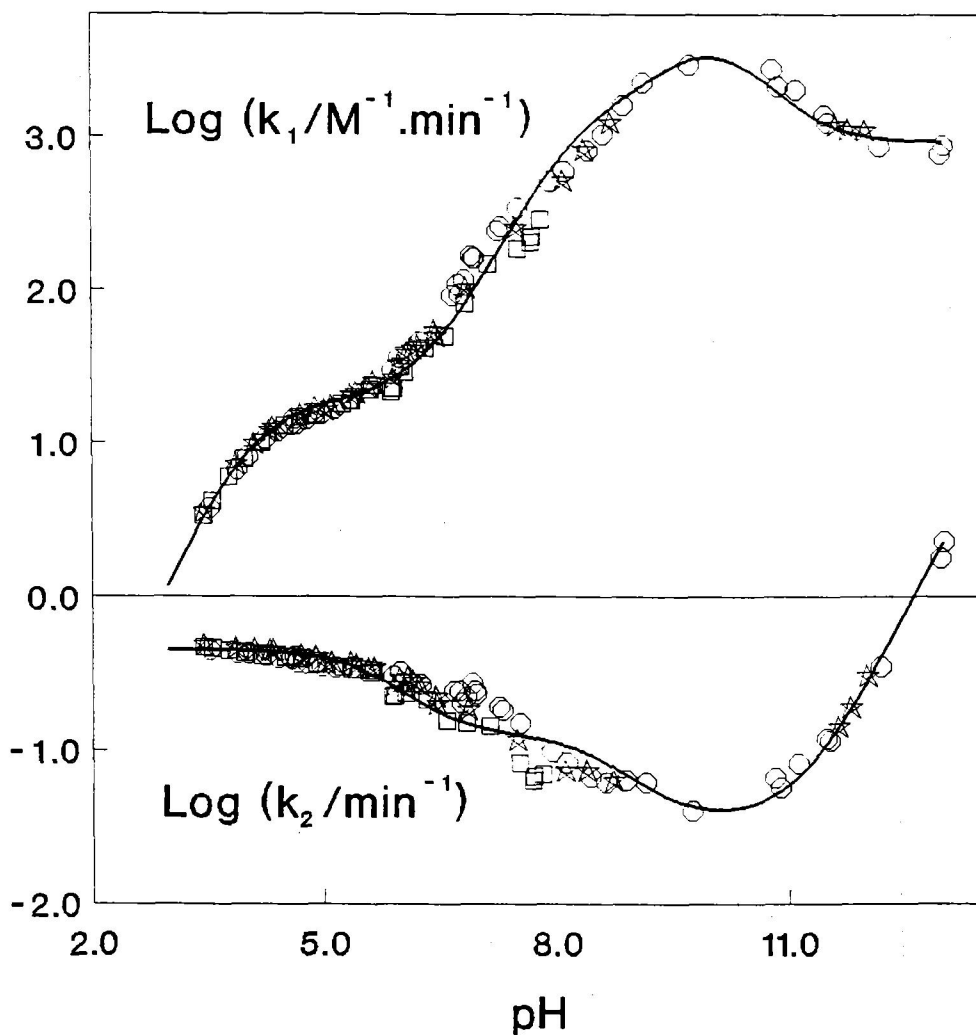


FIGURA 67. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas de formación e hidrólisis,  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 para  $k_1$  y  $k_2$  respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas en los ajustes (tabla 4). Los símbolos representan los valores de  $k_1$  y  $k_2$  obtenidos a partir de los valores de  $k_{ap}$  dados en la figura 63, usando las ecuaciones 126 y 125, respectivamente. Los distintos tipos de símbolo se refieren a las concentraciones de n-hexilamina correspondientes a los valores de  $k_{ap}$  usados en el cálculo de  $k_1$  y  $k_2$ . Las concentraciones totales de n-hexilamina son:  $\circ = 0.001$  M,  $\star = 0.0025$  M y  $\square = 0.0095$  M.

de equilibrio previamente obtenidas por métodos potenciométricos.

Las constantes cinéticas aparentes de formación e hidrólisis,  $k_1$  y  $k_2$ , dependen sólo del pH para unas condiciones dadas de temperatura, fuerza iónica y disolvente. El modelo más simple para explicar la variación con el pH de  $k_1$  y  $k_2$  es suponer que cada especie iónica del PLP (para la formación) o de la base de Schiff (para la hidrólisis) reacciona con una constante de velocidad determinada e invariante con el pH (Sánchez-Ruiz et al, 1982; Llor et al, 1984; Garcia del Vado et al, 1987 y 1988; Vázquez et al, 1988 y 1989). Es decir, el efecto del pH sobre  $k_1$  y  $k_2$  se debe a la variación de las fracciones de las especies iónicas del PLP o de la base de Schiff al modificar la concentración de  $H^+$  de la disolución (figuras 9-12 y 30-33).

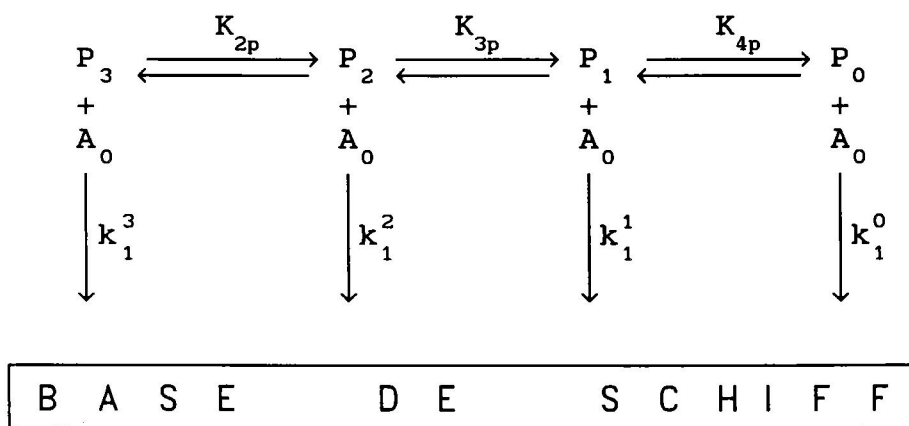
#### 1. Constante de velocidad de formación, $k_1$ .

Suponemos que cada especie iónica del PLP,  $P_1$ , reacciona con la forma no protonada de la amina,  $A_0$ , con una constante de velocidad determinada e invariante con el pH,  $k_1^1$ . Es decir, la variación de  $k_1$  con el pH se debe al efecto del pH sobre la fracción de las especies iónicas del PLP y sobre el grado de protonización de la amina.

Las distintas especies iónicas del PLP están dadas en los esquemas 1 (agua pura) y 2 (mezcla con un 0.6 de fracción en volumen de dioxano). El hecho de que cada especie del PLP esté en equilibrio con una cierta cantidad de forma hidrato (sección 3.1.) no afecta al planteamiento cinético ya que la velocidad de deshidratación es bastante más rápida que la velocidad de

formación de base de Schiff (Ahrens et al, 1970) por lo que en todo instante de una cinética existe equilibrio entre aldehído e hidrato.

Según todo esto el esquema a considerar es el siguiente:



### ESQUEMA 9

La velocidad de la reacción directa,  $v_1$ , vendrá dada por:

$$v_1 = \sum_{i=0}^3 k_1^i \cdot [A_0] \cdot [P_i] \quad (127)$$

Según la ecuación de las fracciones de las especies iónicas del PLP,  $p_i$ , (ecuación 10), la concentración de cada especie del PLP será:

$$[P_i] = p_i \cdot [P]_t \quad (128)$$



donde  $[P]_t$  es la concentración total de PLP (ecuación 8). Sustituyendo en 127 tenemos:

$$v_1 = [A_0] \cdot [P]_t \cdot \sum_{i=0}^3 k_1^i \cdot p_i \quad (129)$$

Por otro lado, la constante de formación de base de Schiff experimental viene definida como:

$$k_1 = \frac{v_1}{[P]_t \cdot [A]_t} \quad (130)$$

La expresión de  $[A]_t$  teniendo en cuenta la ecuación de  $a_0$  (fracción de la especie de la amina sin protonar) (ecuación 40) es:

$$[A]_t = [A_0] \cdot Z_a \quad (131)$$

Sustituyendo  $[A]_t$  y  $v_1$  (ecuación 129) en  $k_1$  (ecuación 130) obtenemos:

$$k_1 = \frac{1}{Z_a} \cdot \sum_{i=0}^3 k_1^i \cdot p_i \quad (132)$$

ecuación que nos da la expresión de la constante de velocidad de formación aparente  $k_1$  en función de las constantes cinéticas de formación para cada especie del PLP,  $k_1^i$ , del pH y de las

constantes de ionización del PLP y de la n-hexilamina (téngase en cuenta las ecuaciones de  $Z_a$  (ecuación 49) y la de  $p_1$  (ecuación 12)).

Esta ecuación nos permite obtener los valores de  $k_1^i$  mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos de  $k_1$  en función del pH. Hemos utilizado, como en casos anteriores, el P.G.P (sección 3. 4.) escribiendo la subrutina correspondiente. Esta subrutina permite el cálculo de  $k_1$  (variable dependiente) en términos del pH (variable independiente), de  $\log k_1^i$  (parámetros ajustables) y de los pK del PLP y de la n-hexilamina. Los valores de éstos se fijaron en los obtenidos anteriormente (sección 4. 1. 4., tabla 2). En este caso no tenemos necesidad de plantear ningún procedimiento iterativo y la subrutina (en el apéndice II. 4. se muestra su código fuente) se limita a la definición de la función a la que hay que aplicar el ajuste no lineal de mínimos cuadrados (ecuación 132) (se ha introducido el valor de  $\gamma_{\pm}$  correspondiente a la fuerza iónica a la que se han realizado los experimentos, 0.01).

Los ajustes se realizaron a todos los valores de  $k_1$  en función del pH para cada mezcla agua-dioxano dejando variables todos los parámetros, es decir, todos los  $k_1^i$ . Los resultados de estos ajustes se muestran en las figuras 64-67 donde podemos observar que las curvas teóricas coinciden bastante bien con nuestros datos experimentales. Hay que señalar que en la mezcla del 0.4 de fracción en volumen de dioxano el ajuste no era sensible a  $k_1^0$  por lo que no hemos podido determinar esta constante cinética. Este hecho se puede explicar si tenemos en cuenta el pH

más básico al que hemos podido realizar las cinéticas en esta mezcla (pH 9.6 para  $c_{a0} = 0.001$  M) (figura 62) y que a este valor de pH la fracción de la especie iónica  $P_0$  es todavía muy pequeña ya que el pK correspondiente a la ionización entre las especies iónicas  $P_1$  y  $P_0$  en esta mezcla es 10.07 (tabla 2). En la mezcla del 0.6 de fracción en volumen de dioxano, a pesar de que la proporción de dioxano es mayor, el ajuste si ha sido sensible a todas las constantes cinéticas ya que disponemos de valores de  $k_{ap}$  a pH más básico (ver figura 63).

En la figura 68 hemos representado las curvas teóricas de  $\log k_1$  calculadas a partir de la ecuación 132 utilizando los  $k_1^i$  obtenidos de los ajustes para todas las mezcla agua-dioxano estudiadas.

## 2. Constante de velocidad de hidrólisis, $k_2$ .

El modelo para interpretar la variación de  $k_2$  con el pH es algo más complejo que el anterior. En la figuras 64 y 67 se observa un aumento brusco de  $k_2$  a partir de pH 8.5 en agua y a partir de pH 10.4 en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano. Este aumento de  $k_2$  es frecuente (Snell et al, 1968; Sánchez-Ruiz et al, 1982; Llor et al, 1984; García del Vado et al, 1988; Vázquez et al, 1988 y 1989) y ocurre en bases de Schiff de compuestos similares al PLP tales como salicilaldehído (Hercovitch et al, 1974), piridin 4-aldehído (Llor et al, 1989) y 3-hidroxipiridina 4-aldehído (French et al, 1965; Auld y Bruice, 1967) y se atribuye a la reacción directa del  $\text{OH}^-$  con la base. Por otro lado el  $\text{pK}_{2b}$  varía entre 6.87 (en agua) y 9.43 (en la mezcla

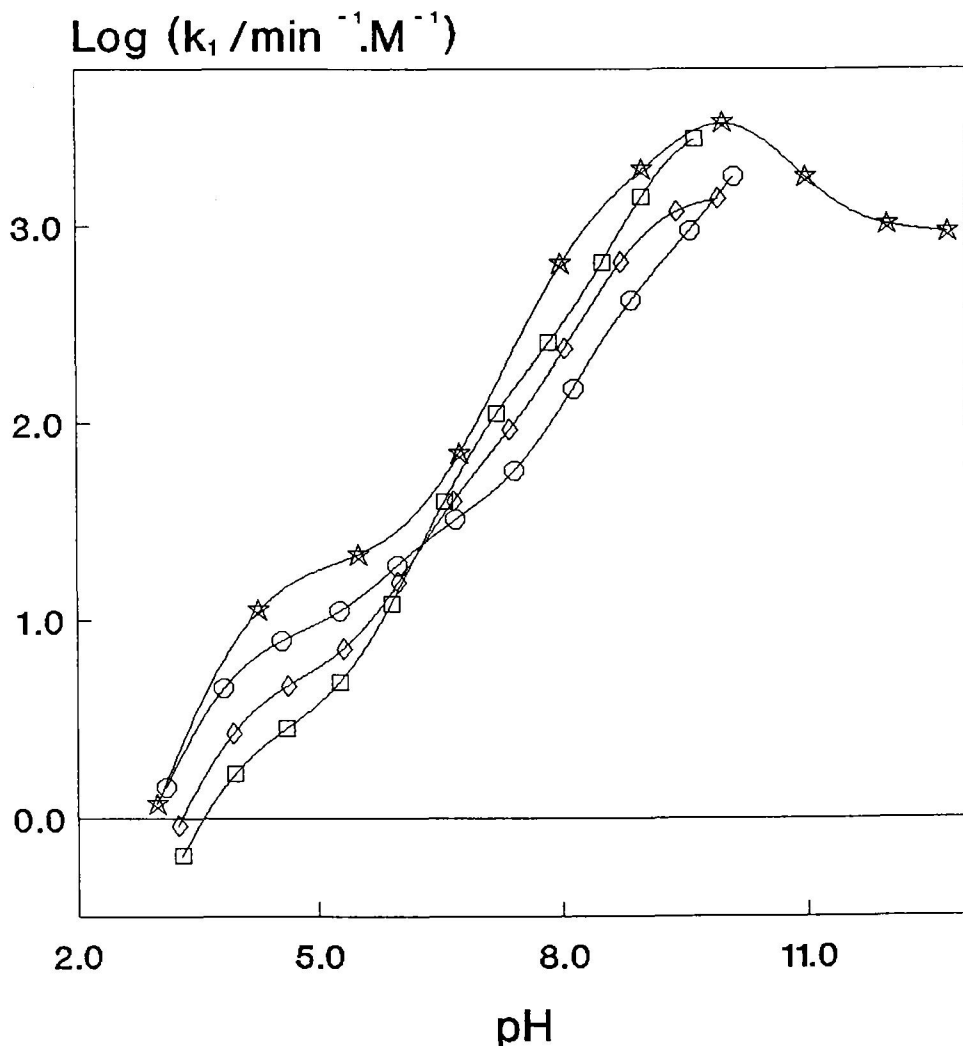
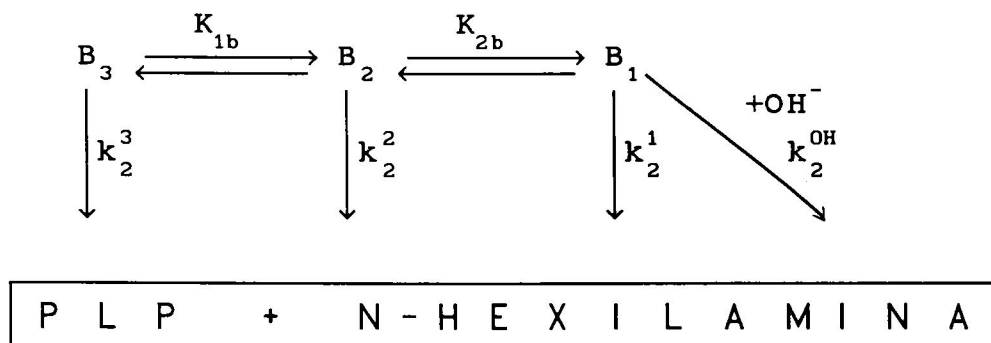


FIGURA 68. Efecto del pH sobre la constante cinética de formación en mezclas agua-dioxano a 25 °C. En la figura se han representado las curvas teóricas obtenidas para cada mezcla a partir de la ecuación 132 utilizando los valores de las constantes cinéticas individuales procedentes de los ajustes (tabla 4). La fracción de volumen de dioxano de cada mezcla es: o = 0, ◇ = 0.2, □ = 0.4 y ☆ = 0.6.

con un 0.6 de fracción en volumen de dioxano) (tabla 2) y el  $pK_{3b}$  está por encima de 12.5 (tabla 3), por lo cual el aumento de  $k_2$  a pH básico no es atribuible a la hidrólisis de la especie  $B_0$ . También hay que tener en cuenta que la forma deprotonada de la base de Schiff,  $B_0$ , no debe ser un electrófilo fuerte y sería de esperar una constante de velocidad baja.

Según todo esto se atribuye el aumento de  $k_2$  a pH básico a la reacción del  $OH^-$  con la forma monoprotonada de la base,  $B_1$ . El esquema a considerar es:



ESQUEMA 10

donde  $k_2^1$  es la constante de velocidad de pseudo primer orden, invariante con el pH, de la especie  $B_1$  y  $k_2^{OH}$  la constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre  $B_1$  y  $OH^-$ .

Según este esquema, la velocidad de hidrólisis viene dada por:

$$v_2 = k_2^{\text{OH}} \cdot [B_1] \cdot [\text{OH}^-] + \sum_{i=1}^3 k_2^i \cdot [B_1] \quad (133)$$

y la constante de hidrólisis experimental será:

$$k_2 = \frac{v_2}{[B]_t} \quad (134)$$

Si tenemos en cuenta la ecuación de las fracciones de las especies iónicas de la base de Schiff,  $b_i$  (ecuación 39) la concentración de  $B_i$  es:

$$[B_i] = [B]_t \cdot b_i \quad (135)$$

donde  $[B]_t$  es la concentración total de base de Schiff (ecuación 34). Sustituyendo en  $k_2$  (ecuación 134) tendremos:

$$k_2 = k_2^{\text{OH}} \cdot b_1 \cdot [\text{OH}^-] + \sum_{i=1}^3 k_2^i \cdot b_i \quad (136)$$

Esta ecuación nos muestra  $k_2$  como una función de las constantes cinéticas  $k_2^i$  y  $k_2^{\text{OH}}$ , del pH y de las constantes de equilibrio de ionización de la imina y nos permite obtener  $k_2^i$  y  $k_2^{\text{OH}}$  mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a nuestros datos de  $k_2$  en función del pH. El procedimiento que hemos seguido es totalmente análogo al utilizado para  $k_1$ . También hemos utilizado el P.G.P. (sección 3. 4.) y en este caso la subrutina usada nos permite obtener  $k_2$  (variable dependiente) en función del

pH (variable independiente), de  $\log k_2^i$  y  $\log k_2^{OH}$  (parámetros ajustables) y de los pK de la base de Schiff, (en el apéndice II. 5. se muestra el código fuente de la subrutina). Estos valores de pK se fijaron en todos los ajustes en los obtenidos en la sección 4. 1. 4. (tabla 2).

Los ajustes se realizaron a todos los datos de  $k_2$  en función del pH para cada mezcla agua-dioxano dejando variables todos los parámetros es decir, todos los  $k_2^i$  y  $k_2^{OH}$ . Los resultados de estos ajustes se muestran en las figuras 64-67 donde podemos observar que la coincidencia entre las curvas teóricas y los datos experimentales es bastante buena. En la mezcla del 0.4 de fracción en volumen de dioxano el ajuste no era sensible a  $k_2^{OH}$  y no hemos podido determinar esta constante cinética. Para explicar este hecho debemos tener en cuenta que el valor de pH más básico al que hemos podido realizar las cinéticas en esta mezcla ha sido 9.6 para  $c_{a0} = 0.001$  M (figura 62) y que a este valor de pH la concentración de  $OH^-$  es muy pequeña.

En la tabla 4 se muestran los valores óptimos de  $\log k_1^i$ ,  $\log k_2^i$  y  $\log k_2^{OH}$  obtenidos en los ajustes para cada mezcla agua-dioxano.

En la figura 69 se representan las curvas teóricas de  $\log k_2$  calculadas a partir de la ecuación 136 utilizando los valores de  $k_2^i$  y  $k_2^{OH}$  obtenidos en los ajustes para todas las mezclas agua-dioxano estudiadas.

TABLA 4. Valores óptimos de  $\log k_1^1$  (Tabla 4.a),  $\log k_2^1$  y  $\log k_2^{\text{OH}}$  (Tabla 4.b) obtenidos a partir de los ajustes de las ecuaciones 132 y 136 a los datos experimentales de  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, a 25 °C en mezclas agua-dioxano.  $\Phi_D$  representa la fracción en volumen de dioxano.

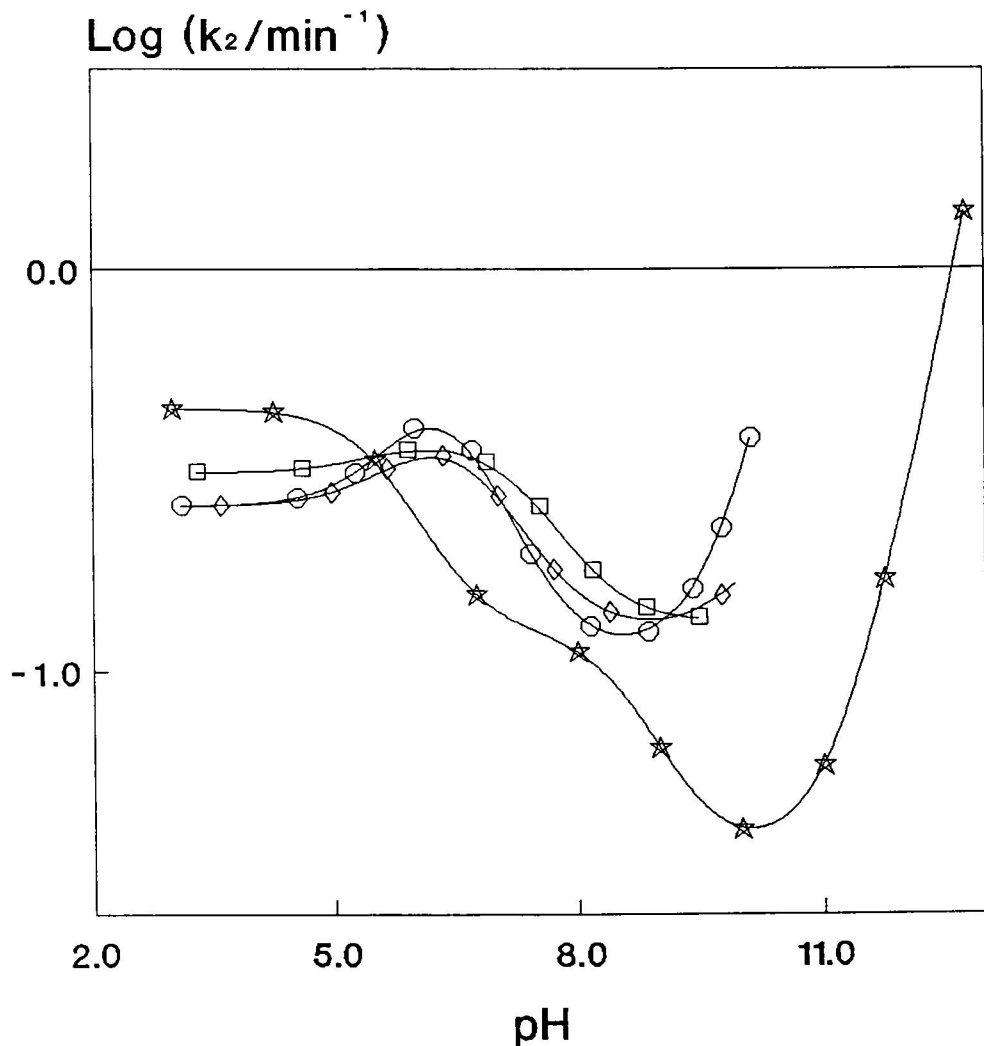
TABLA 4.a.

$\Phi_D$	$\log k_1^0$	$\log k_1^1$	$\log k_1^2$	$\log k_1^3$
0	3.75	4.64	5.97	7.77
0.2	3.12	4.72	5.55	7.23
0.4	-	4.46	5.29	6.81
0.6	2.96	4.11	5.11	7.31

TABLA 4.b.

$\Phi_D$	$\log k_2^1$	$\log k_2^2$	$\log k_2^3$	$\log k_2^{\text{OH}}$
0	-0.958	-0.242	-0.602	3.26
0.2	-0.907	-0.390	-0.587	3.15
0.4	-0.880	-0.433	-0.506	-
0.6	-1.49	-0.870	-0.329	3.85





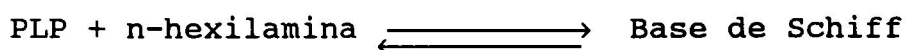
**FIGURA 69.** Efecto del pH sobre la constante cinética de hidrólisis en mezclas agua-dioxano a 25 °C. En la figura se han representado las curvas teóricas obtenidas para cada mezcla a partir de la ecuación 136 utilizando los valores de las constantes cinéticas individuales procedentes de los ajustes (tabla 4). La fracción de volumen de dioxano de cada mezcla es:  $\circ = 0$ ,  $\diamond = 0.2$ ,  $\square = 0.4$  y  $\star = 0.6$ .



6. CINETICA DE FORMACION E HIDROLISIS  
DE LA BASE DE SCHIFF DEL 5'-FOSFATO  
DE PIRIDOXAL CON N-HEXILAMINA  
A PARTIR DE DATOS POTENCIOMETRICOS



En la sección 4. 1. se ha descrito el método utilizado para determinar las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas y de formación de la base de Schiff formada entre el PLP y la n-hexilamina mediante una valoración potenciométrica con KOH del sistema en equilibrio:



Al realizar estos experimentos hemos observado que, tras la adición de KOH, el tiempo necesario para que se estabilice la lectura del pH-metro es considerablemente mayor que el tiempo de respuesta del electrodo y que esto no ocurre en las valoraciones potenciométricas de PLP (figura 70). Este comportamiento se observa a partir de pH alrededor de 5.5 y hasta pH 8.8 en agua y pH 8.3 en la mezcla con un contenido del 0.6 de fracción en volumen de dioxano. En esta última mezcla se observa también que en las valoraciones con disoluciones de concentración más pequeña, el tiempo necesario para que se estabilice la lectura del pH-metro vuelve a aumentar entre pH 11 y pH 12.4 (figuras 71-74).

El efecto observado en la figura 70 puede explicarse cualitativamente de la forma siguiente:

1. Inmediatamente antes de una adición de KOH el sistema se encuentra en equilibrio y, por tanto, las concentraciones de PLP, n-hexilamina y base de Schiff son las dadas por la constante de

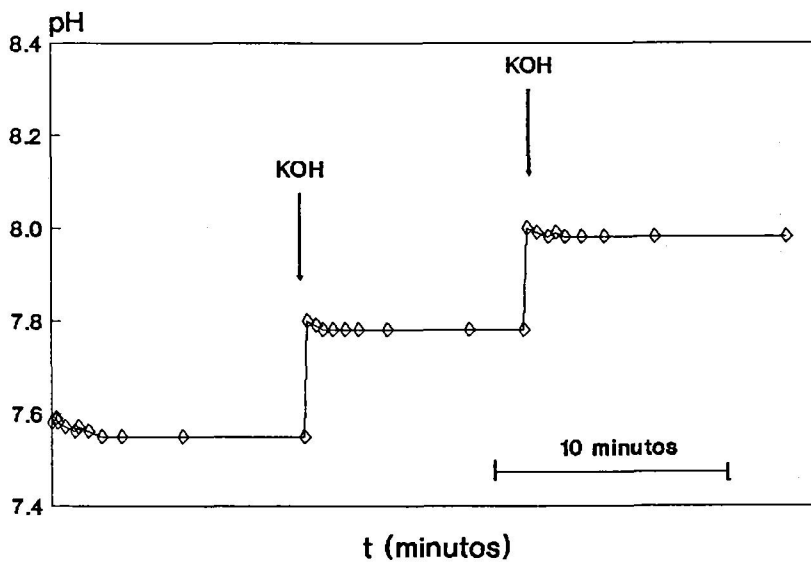
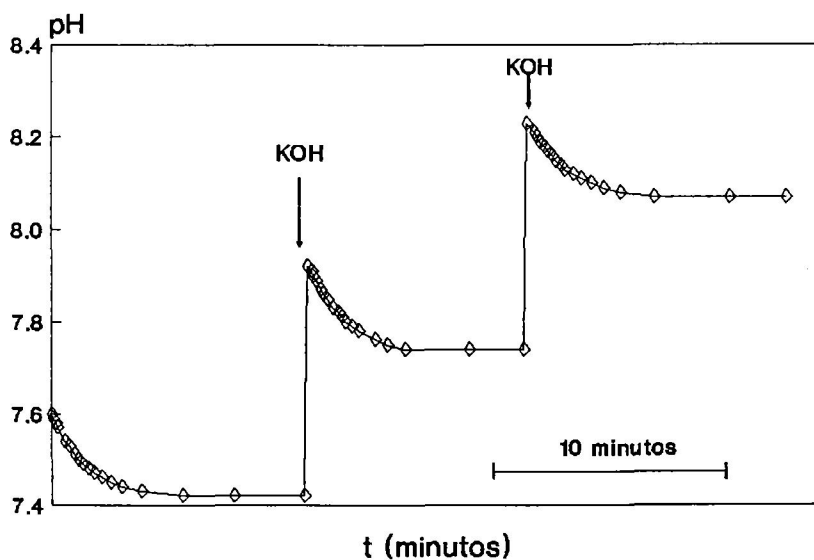


FIGURA 70. Variación del pH frente al tiempo correspondiente a la valoración con KOH del sistema PLP + n-hexilamina + base de Schiff (figura superior) y de PLP solo (figura inferior) en agua pura a 25 °C. Las valoraciones corresponden a:  $c_1$  en figura 14 (PLP y n-hexilamina, figura superior) y  $c_1$  en figura 1 (PLP, figura inferior). Las flechas indican el momento en que se efectuaba la adición de KOH.

equilibrio  $K_{pH}$ , al correspondiente valor de pH.

2. La adición de KOH origina un cambio brusco en el pH y, por consiguiente, en el valor de  $K_{pH}$  (ver figuras 34-37). Este cambio inicial de pH (y, por supuesto, de concentración debido a la dilución), sin embargo, es muy rápido, por lo que las concentraciones de PLP, n-hexilamina y base de Schiff no se modifican apreciablemente durante el cambio inicial. Como consecuencia, el sistema inmediatamente después de la adición no se encuentra en equilibrio, ya que las concentraciones no corresponden al nuevo valor de  $K_{pH}$ .

3. A continuación las concentraciones de PLP, n-hexilamina y base de Schiff se modificarán para alcanzar la nueva situación de equilibrio. Dado que las constantes de ionización del PLP y de la base de Schiff son diferentes, esto provocará una cesión de protones al medio y, por tanto, un nuevo cambio en el pH. Este cambio es ahora lento, debido a la cinética de formación e hidrólisis de la base de Schiff. Por supuesto, el valor de  $K_{pH}$  variará en el transcurso de este segundo cambio de pH; sin embargo, se alcanzará finalmente un pH de equilibrio,  $pH_f$ , en el que las concentraciones de PLP, n-hexilamina y base de Schiff sean las correspondientes al valor de  $K_{pH}$  a ese pH final.

De acuerdo con esta interpretación la variación de pH observada contiene información sobre la cinética de formación e hidrólisis de la base de Schiff. Para comprobar esta hipótesis, deduciremos a continuación las ecuaciones que permiten obtener  $k_1$  y  $k_2$  a partir del cambio del pH (ecuaciones 157 y 158) y posteriormente compararemos los resultados obtenidos aplicando

estas ecuaciones con los valores de las constantes cinéticas obtenidas espectrofotométricamente.

Consideraremos como punto de partida la ecuación general que describe la velocidad de la reacción entre PLP y n-hexilamina para producir base de Schiff:

$$-\frac{dc_a}{dt} = -\frac{dc_p}{dt} = \frac{dc_b}{dt} = k_1 \cdot c_a \cdot c_p - k_2 \cdot c_b \quad (137)$$

donde  $k_1$  es la constante cinética de formación de segundo orden y  $k_2$  la constante cinética de hidrólisis de pseudo primer orden que incluye la concentración de agua; ambas constantes dependen sólo del pH para unas condiciones dadas de temperatura, disolvente y fuerza iónica.  $c_a$ ,  $c_p$  y  $c_b$  representan las concentraciones de n-hexilamina, PLP y base de Schiff, respectivamente en cualquier instante  $t$ .

Por analogía con los tratamientos empleados en las técnicas de relajación para el estudio de cinéticas rápidas (salto de temperatura, por ejemplo) supondremos que la perturbación introducida en el sistema por la adición de KOH es pequeña. Es decir, dado que el cambio de pH es siempre pequeño (ver figura 70), supondremos que la variación en las concentraciones de PLP, amina y base de Schiff también lo es. Dentro de esta aproximación, podemos suponer además que las constantes  $k_1$  y  $k_2$  no se modifican apreciablemente en el transcurso del establecimiento del equilibrio y las atribuiremos en cada caso al pH final. Tal como se demuestra a continuación, la aproximación empleada equivale a: a) el observable medido (pH) cambia linealmente con la extensión



del proceso (ecuaciones 156 y 158); b) la variación del observable con el tiempo viene descrita por una relajación de primer orden (ecuación 160).

Podemos expresar las concentraciones  $c_a$ ,  $c_p$  y  $c_b$  que hay en cualquier instante del proceso de relajación en función de las concentraciones presentes en el estado final de equilibrio ( $c_{af}$ ,  $c_{pf}$ ,  $c_{bf}$ ) como:

$$c_a = c_{af} + x \quad (138)$$

$$c_p = c_{pf} + x \quad (139)$$

$$c_b = c_{bf} - x \quad (140)$$

donde el subíndice f representa los valores de  $c_a$ ,  $c_p$  y  $c_b$  al nuevo pH del equilibrio final y  $x$  es la variación de la concentración de PLP, amina o base de Schiff respecto de la concentración final en cualquier instante  $t$ , es decir:

$$x = c_{bf} - c_b = c_a - c_{af} = c_p - c_{pf} \quad (141)$$

De estas relaciones deducimos que:

$$\frac{dc_a}{dt} = \frac{dc_p}{dt} = - \frac{dc_b}{dt} = \frac{dx}{dt} \quad (142)$$

Sustituyendo en la ecuación 137 tenemos:

$$-\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot (c_{af} + x) \cdot (c_{pf} + x) - k_2 \cdot (c_{bf} - x) \quad (143)$$

y operando:

$$-\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot c_{pf} \cdot c_{af} - k_2 \cdot c_{bf} + x \cdot [k_1 \cdot (c_{pf} + c_{af}) + k_2] + k_1 \cdot x^2 \quad (144)$$

La ecuación que describe el sistema cuando se alcanza de nuevo el equilibrio es la siguiente:

$$k_1 \cdot c_{af} \cdot c_{pf} - k_2 \cdot c_{bf} = 0 \quad (145)$$

Sustituyendo esta ecuación en 144 obtenemos:

$$-\frac{dx}{dt} = x \cdot [k_1 \cdot (c_{pf} + c_{af}) + k_2] + k_1 \cdot x^2 \quad (146)$$

Como hemos supuesto que la perturbación introducida en el sistema es pequeña tenemos que:

$$|x| \ll c_f \quad (147)$$

donde  $c_f$  representa a  $c_{af}$ ,  $c_{pf}$  y  $c_{bf}$ . Podemos, por tanto, despreciar el término en  $x^2$  que aparece en la ecuación 146:

$$\frac{dx}{dt} = - [k_1 \cdot (c_{pf} + c_{af}) + k_2] \cdot x \quad (148)$$

Hemos obtenido una ecuación de un proceso cinético de primer orden. Separando variables e integrando:

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = - \int_0^t \left[ k_1 \cdot (c_{pf} + c_{af}) + k_2 \right] \cdot dt \quad (149)$$

cuyo resultado es:

$$\ln \frac{x}{x_0} = - \left[ k_1 \cdot (c_{pf} + c_{af}) + k_2 \right] \cdot t \quad (150)$$

siendo

$$x_0 = c_{bf} - c_{b0} \quad (151)$$

Definiendo el tiempo de relajación,  $\tau$ , como el tiempo necesario para que  $x_0$  disminuya en un factor  $e$  y despejando  $\tau$ :

$$\tau = \left[ k_1 \cdot (c_{pf} + c_{af}) + k_2 \right]^{-1} \quad (152)$$

La ecuación 150 en forma exponencial viene dada por:

$$x = x_0 \cdot \exp (- t/\tau) \quad (153)$$

Hay que notar, sin embargo, que el observable medido es el pH, y no  $x$ . La relación funcional entre pH y  $x$  es compleja, pero, en cualquier caso, podemos expresarla mediante un desarrollo en serie de Taylor respecto a  $x=0$ :

$$\text{pH}(x) = \text{pH}(0) + \left( \frac{d\text{pH}}{dx} \right)_0 \cdot x + \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{d^2\text{pH}}{dx^2} \right)_0 \cdot x^2 + \dots \quad (154)$$

y, dado que suponemos que la perturbación es pequeña, podemos eliminar los términos de potencias mayores que uno:

$$\text{pH} = \text{pH}_f + \left( \frac{d\text{pH}}{dx} \right)_0 \cdot x \quad (155)$$

donde  $\text{pH}_f$  (es decir,  $\text{pH}(0)$ ) se refiere al pH cuando se alcanza de nuevo el equilibrio, o sea, cuando  $x=0$ .

De esta ecuación se deduce que:

$$\Delta\text{pH} = - \left( \frac{d\text{pH}}{dx} \right)_0 \cdot x \quad (156)$$

donde

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_f - \text{pH} \quad (157)$$

Si hacemos  $x = x_0$  la ecuación 156 se transforma en:

$$\Delta\text{pH}_0 = - \left( \frac{d\text{pH}}{dx} \right)_0 \cdot x_0 \quad (158)$$

siendo

$$\Delta\text{pH}_0 = \text{pH}_f - \text{pH}_0 \quad (159)$$

donde  $\text{pH}_0$  es el pH tras el cambio (casi instantáneo) producido por

la adición de KOH.

Teniendo en cuenta las ecuaciones 156 y 158 podemos expresar la ecuación 153 en términos del pH de la siguiente manera:

$$\text{pH} = \text{pH}_f + \Delta\text{pH}_0 \cdot \exp(-t/\tau) \quad (160)$$

Esta ecuación nos permite obtener el tiempo de relajación mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la misma a nuestros datos experimentales de pH y tiempo. De esta forma obtenemos el valor del tiempo de relajación para cada  $\text{pH}_f$ . Como se puede observar en las figuras 71-74 los ajustes son muy buenos en todos los casos. Este hecho apoya las suposiciones realizadas previamente.

Teniendo en cuenta la ecuación 152 y la relación entre la constantes cinéticas:

$$K_{\text{pH}} = \frac{k_1}{k_2} \quad (111)$$

podemos obtener  $k_1$  y  $k_2$  a partir de los tiempos de relajación medidos como:

$$k_2 = \left[ (K_{\text{pH}} \cdot (c_{\text{pf}} + c_{\text{af}}) + 1) \cdot \tau \right]^{-1} \quad (161)$$

$$k_1 = K_{\text{pH}} \cdot k_2 \quad (162)$$

El valor de  $K_{\text{pH}}$  se ha calculado a partir de la ecuación 52:

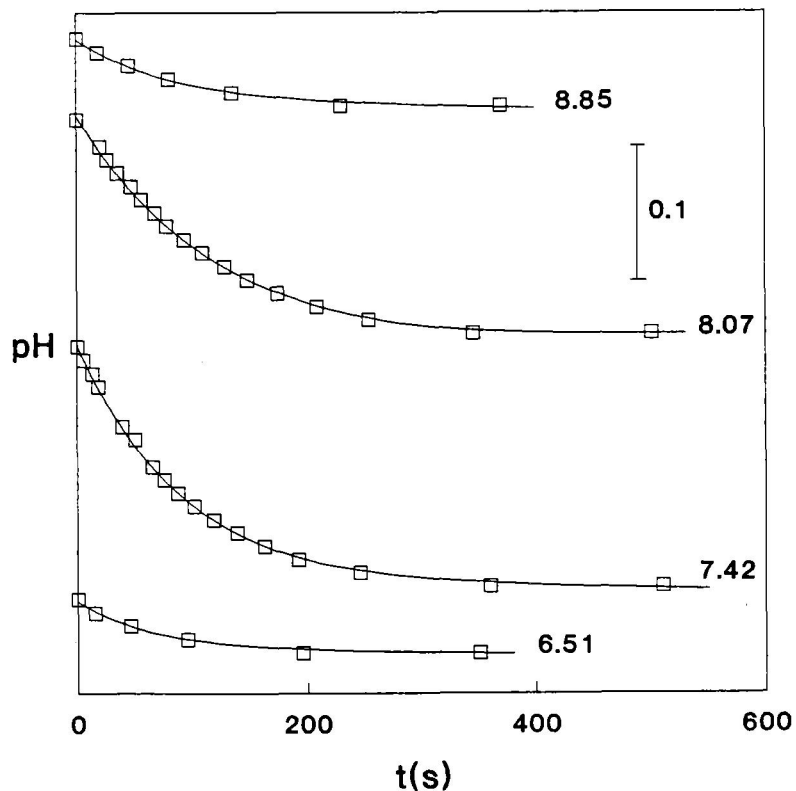


FIGURA 71. Variación del pH frente al tiempo tras la adición de KOH en la valoración del sistema PLP + n-hexilamina + base de Schiff en agua pura a 25 °C a diferentes valores de  $\text{pH}_f$ . (—) curva predicha por la ecuación 160. (□) puntos experimentales. La valoración es la correspondiente a  $c_1$  en la figura 14. El  $\text{pH}_f$  se indica sobre cada curva.

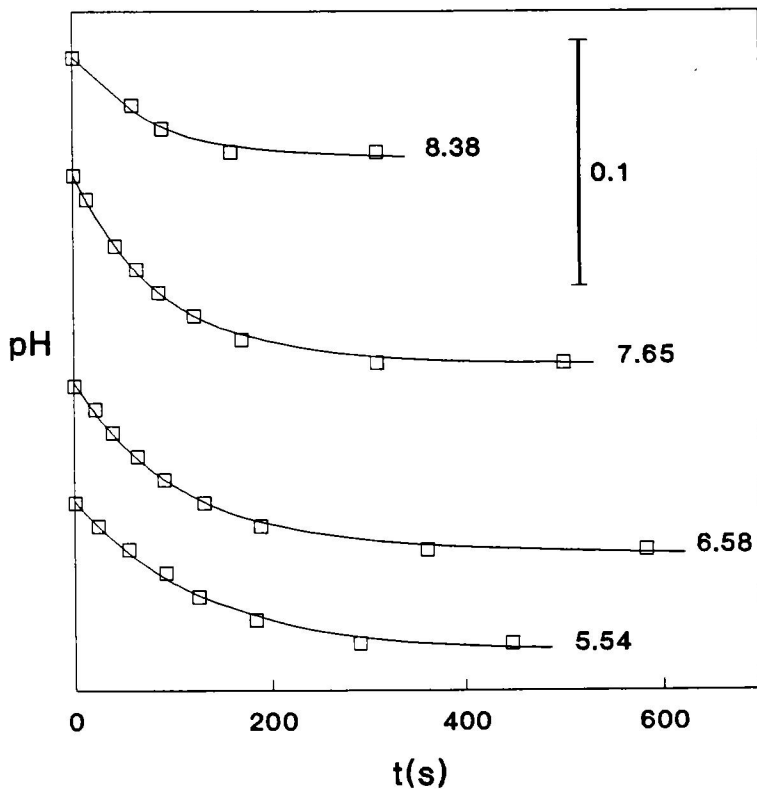


FIGURA 72. Variación del pH frente al tiempo tras la adición de KOH en la valoración del sistema PLP + n-hexilamina + base de Schiff en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C a diferentes valores de  $pH_f$ . (—) curva predicha por la ecuación 160. (□) puntos experimentales. La valoración es la correspondiente a  $c_1$  en la figura 15. El  $pH_f$  se indica sobre cada curva.

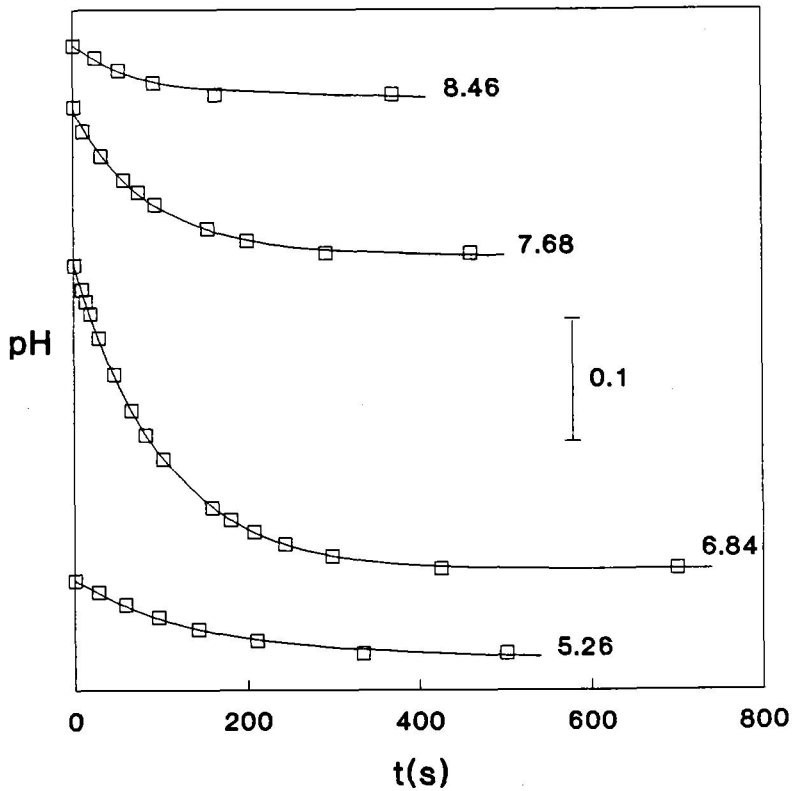


FIGURA 73. Variación del pH frente al tiempo tras la adición de KOH en la valoración del sistema PLP + n-hexilamina + base de Schiff en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C a diferentes valores de  $pH_f$ . (—) curva predicha por la ecuación 160. ( $\square$ ) puntos experimentales. La valoración es la correspondiente a  $c_2$  en la figura 16. El  $pH_f$  se indica sobre cada curva.



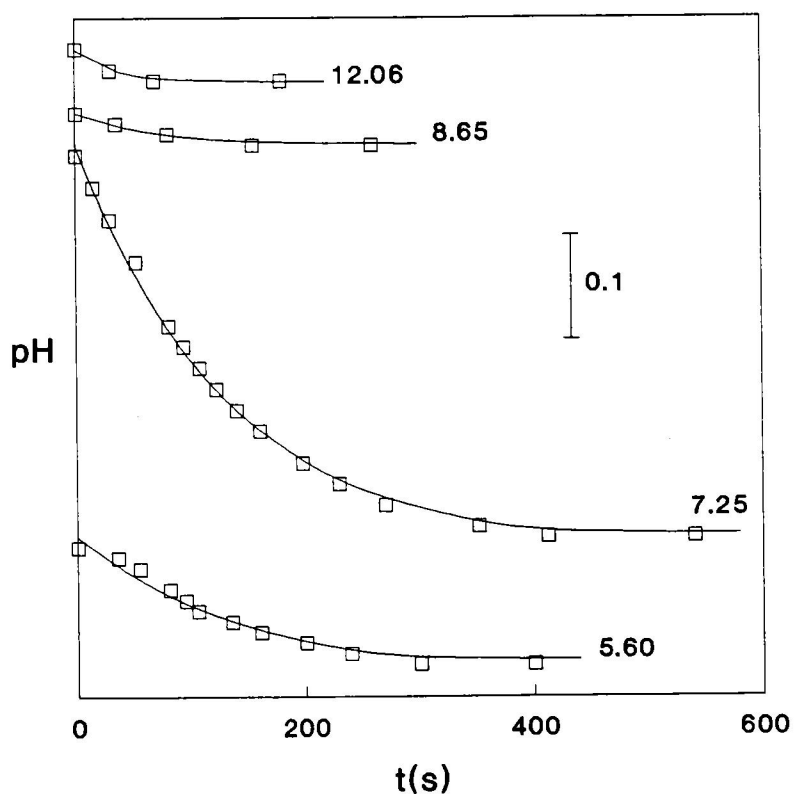


FIGURA 74. Variación del pH frente al tiempo tras la adición de KOH en la valoración del sistema PLP + n-hexilamina + base de Schiff en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C a diferentes valores de  $pH_f$ . (—) curva predicha por la ecuación 160. (□) puntos experimentales. La valoración es la correspondiente a  $c_2$  en la figura 17. El  $pH_f$  se indica sobre cada curva.

$$K_{pH} = K_M \cdot a_H \cdot \frac{Z_b}{Z_p \cdot Z_a} \cdot (\gamma_{\pm})^5 \quad (52)$$

utilizando los valores de las constantes de equilibrio de ionización ( $pK_{ip}$  y  $pK_{ib}$ ) y de formación ( $pK_M$ ) determinadas anteriormente (sección 4. 1. 4., tabla 2) y el valor del coeficiente de actividad correspondiente a la fuerza iónica que hay en cada momento de la valoración.

El método que acabamos de describir nos ha permitido obtener, a partir de cada valoración potenciométrica, los perfiles  $k_1/pH$  y  $k_2/pH$ . Hay que señalar que cada valor de  $k_1$  y  $k_2$ , se asigna al correspondiente valor final de pH,  $pH_f$ , y a la fuerza iónica existente en ese punto de la valoración, (la fuerza iónica, por tanto, no es constante para cada perfil concreto, ver figuras 18-21). En las figuras 75-78 hemos representado las curvas de  $k_1$  y  $k_2$  en función del pH obtenidas a partir de medidas espectrofotométricas (sección 5. 3.) y las constantes cinéticas correspondientes a la valoración que en cada mezcla agua-dioxano tiene una fuerza iónica media más próxima al valor de 0.01 al que se realizaron los experimentos espectrofotométricos. Se puede observar que la coincidencia es bastante buena lo cual apoya las aproximaciones realizadas en la deducción de la ecuación 160, e indica claramente que es posible obtener información sobre la cinética de formación e hidrólisis de base de Schiff a partir de una valoración potenciométrica.

En las figuras 79-82 se representan todos los perfiles  $k_1/pH$  y  $k_2/pH$  obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas. Como era de esperar las constantes cinéticas correspondientes a

valoraciones de fuerza iónica más alta se separan más de las curvas de  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01, siendo mayor la desviación a medida que avanza la valoración (pH más básico) ya que la fuerza iónica va aumentando (figuras 18-21).

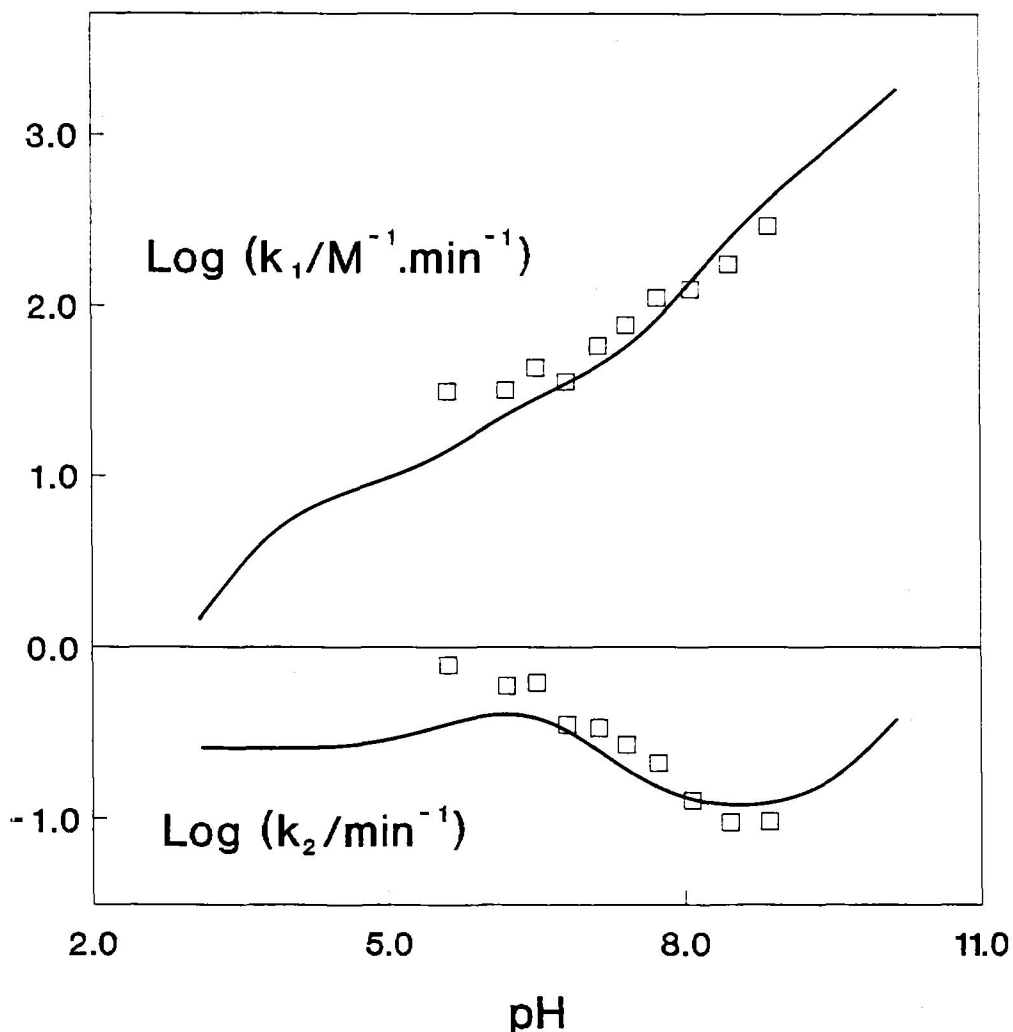


FIGURA 75. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de la valoración potenciométrica de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en agua pura a 25 °C. (□) puntos experimentales de la valoración cuya fuerza iónica es más próxima a 0.01 ( $c_1$  en la figura 14). (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5.3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).

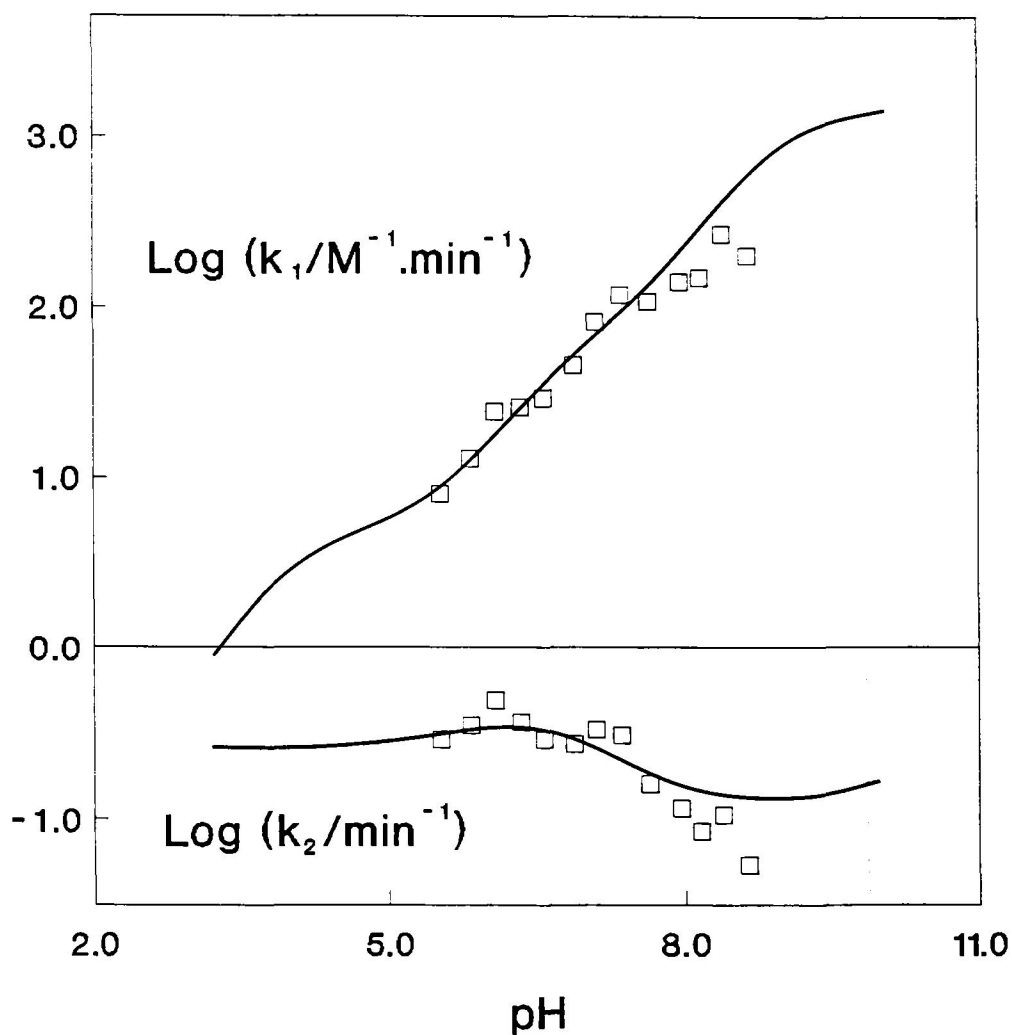


FIGURA 76. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de la valoración potenciométrica de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (□) puntos experimentales de la valoración cuya fuerza iónica es más próxima a 0.01 ( $c_1$  en la figura 15). (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5. 3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).

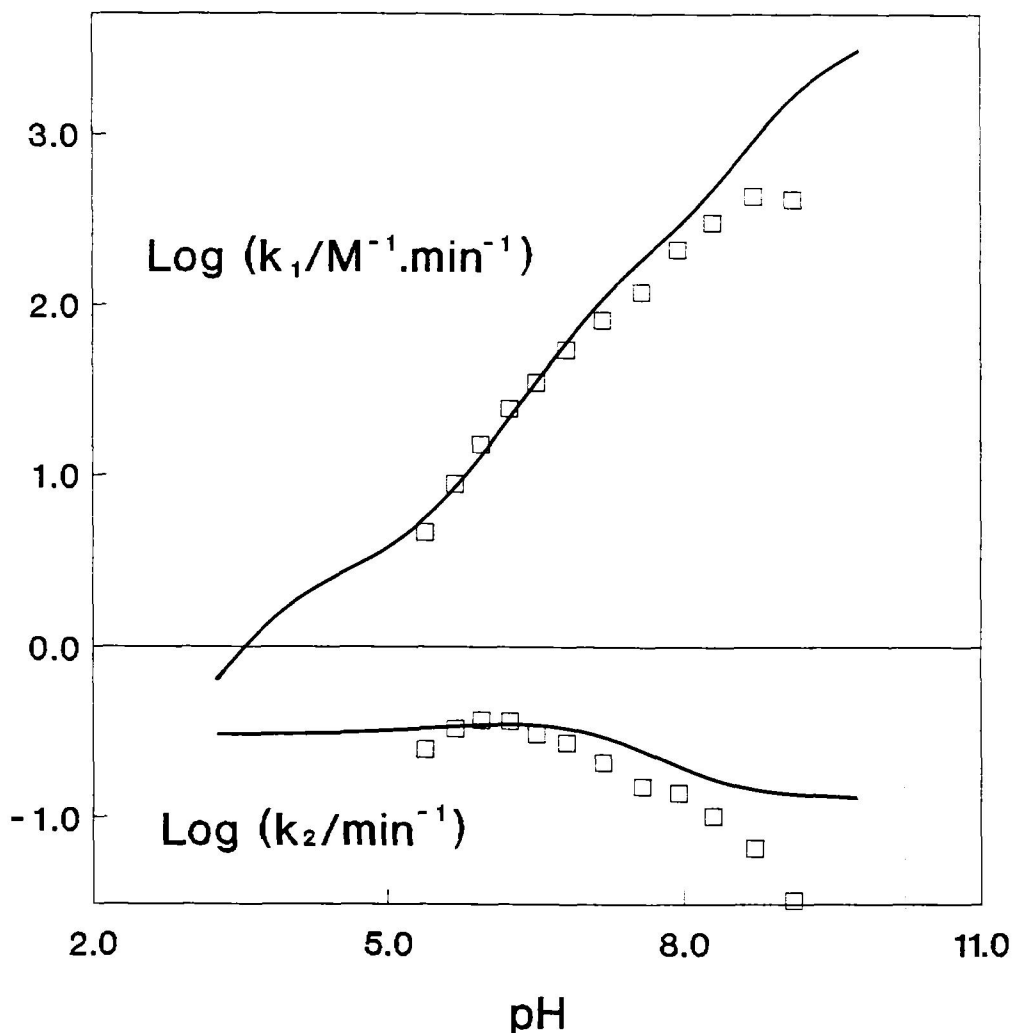


FIGURA 77. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de la valoración potenciométrica de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (□) puntos experimentales de la valoración cuya fuerza iónica es más próxima a 0.01 ( $c_1$  en la figura 16). (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5. 3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).

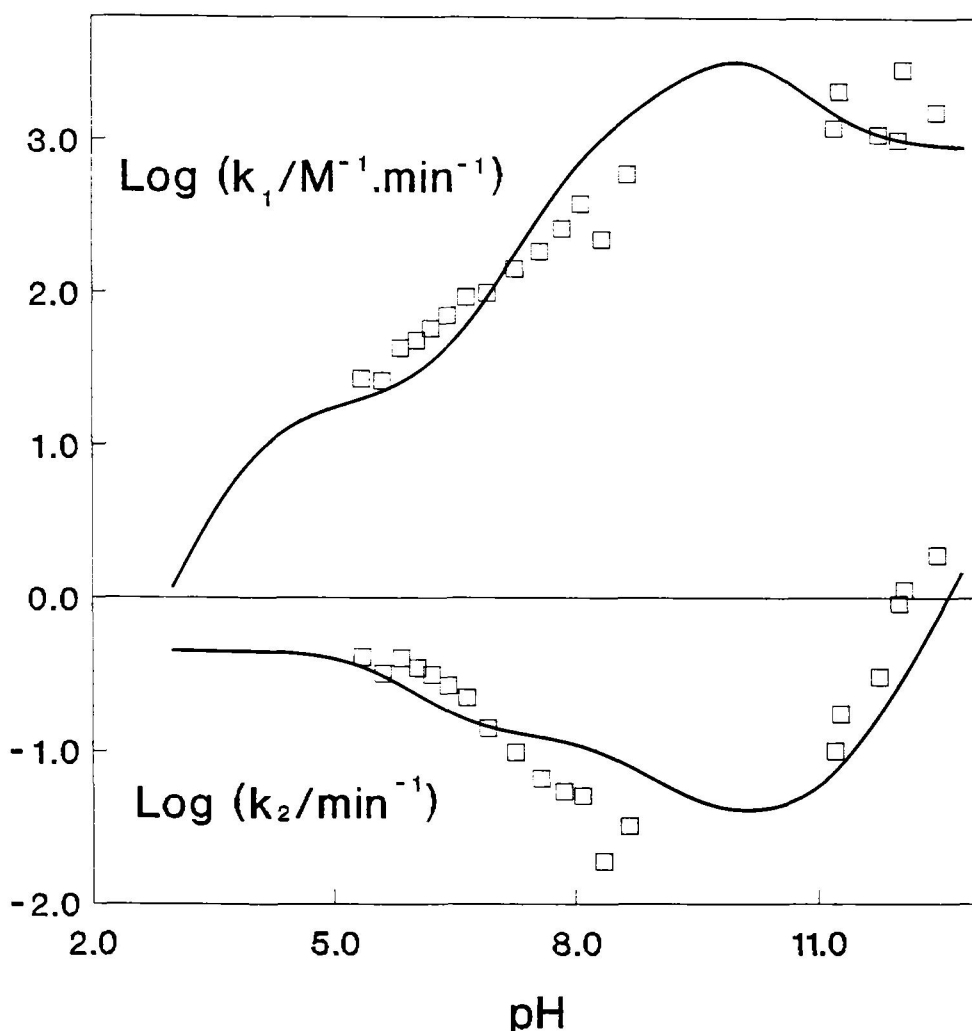


FIGURA 78. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de la valoración potenciométrica de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. (□) puntos experimentales de la valoración cuya fuerza iónica es más próxima a 0.01 ( $c_2$  en la figura 17). (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5. 3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).

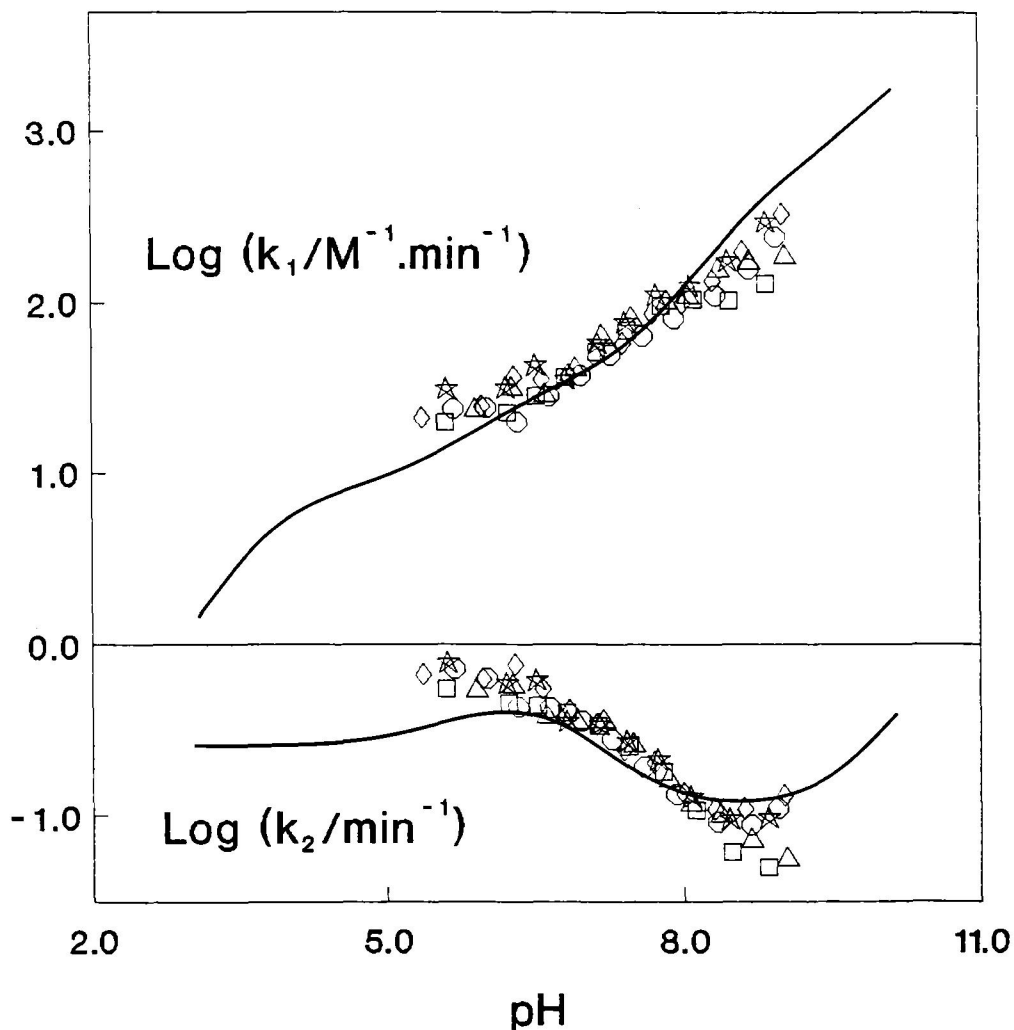


FIGURA 79. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de las valoraciones potenciométricas de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en agua pura a 25 °C. Los símbolos son los puntos experimentales de las valoraciones correspondientes a las de la figura 14 como sigue:  $\star = c_1$ ,  $\Delta = c_2$ ,  $\square = c_3$ ,  $\diamond = c_4$  y  $\circ = c_5$ . (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5.3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).



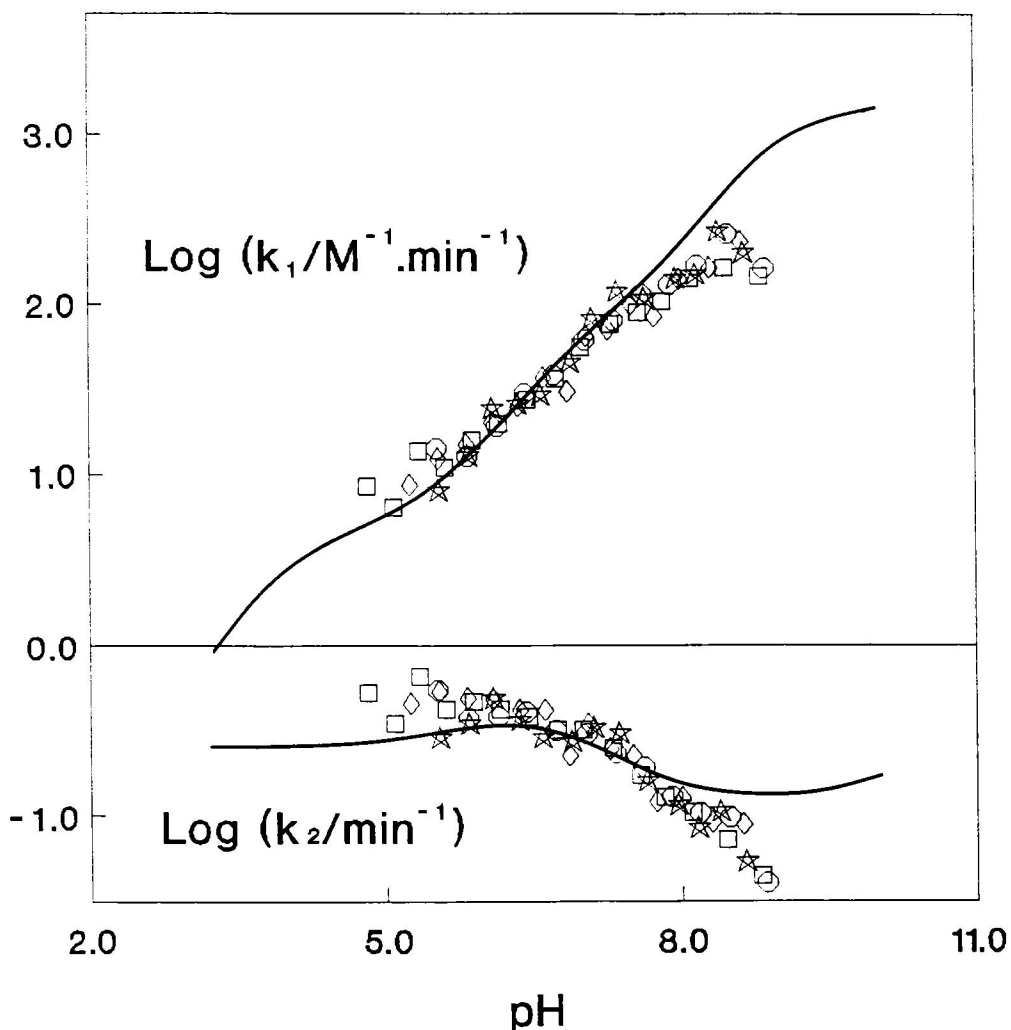


FIGURA 80. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de las valoraciones potenciométricas de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Los símbolos son los puntos experimentales de las valoraciones correspondientes a las de la figura 15 como sigue: ☆ =  $c_1$ , o =  $c_2$ , □ =  $c_3$  y ◇ =  $c_4$ . (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5. 3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).

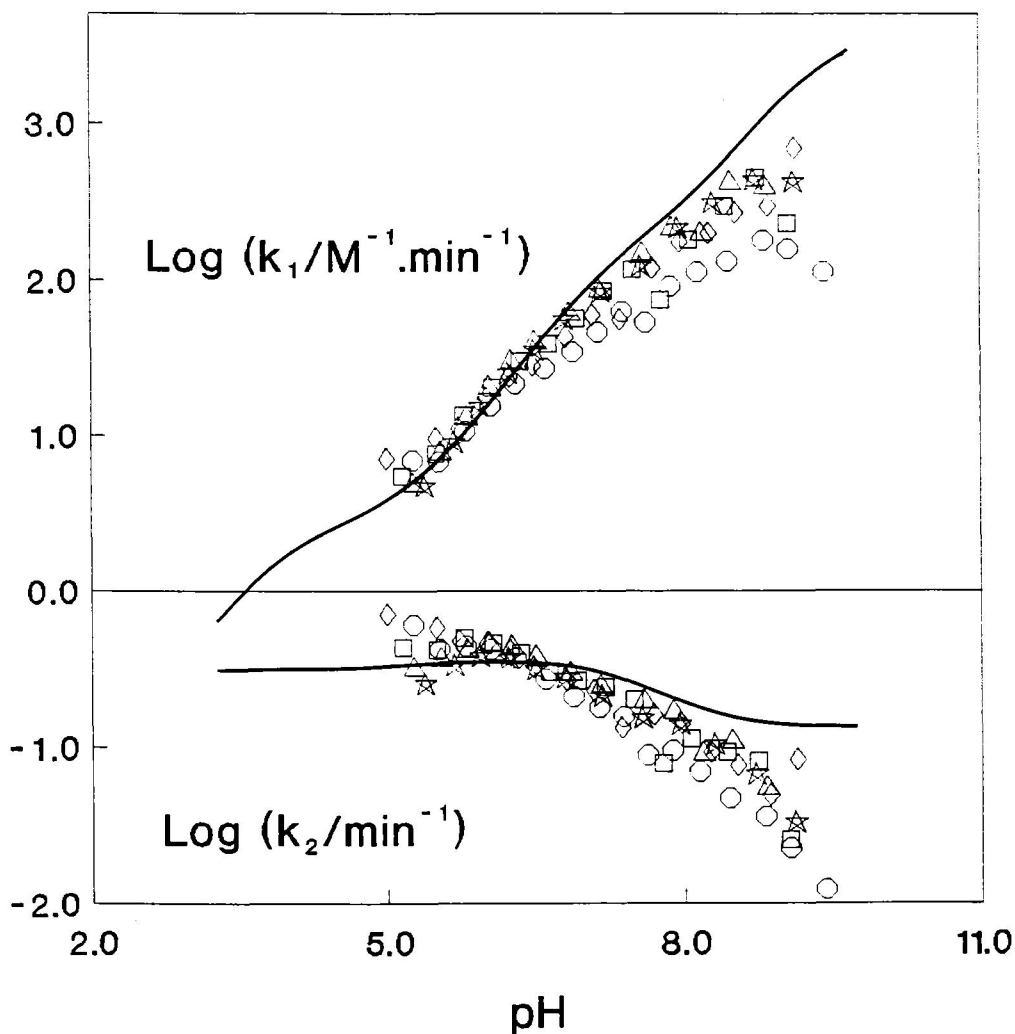


FIGURA 81. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de las valoraciones potenciométricas de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Los símbolos son los puntos experimentales de las valoraciones correspondientes a las de la figura 16 como sigue: ☆ =  $c_1$ , Δ =  $c_2$ , ◻ =  $c_3$ , ◊ =  $c_4$  y ○ =  $c_5$ . (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5. 3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).

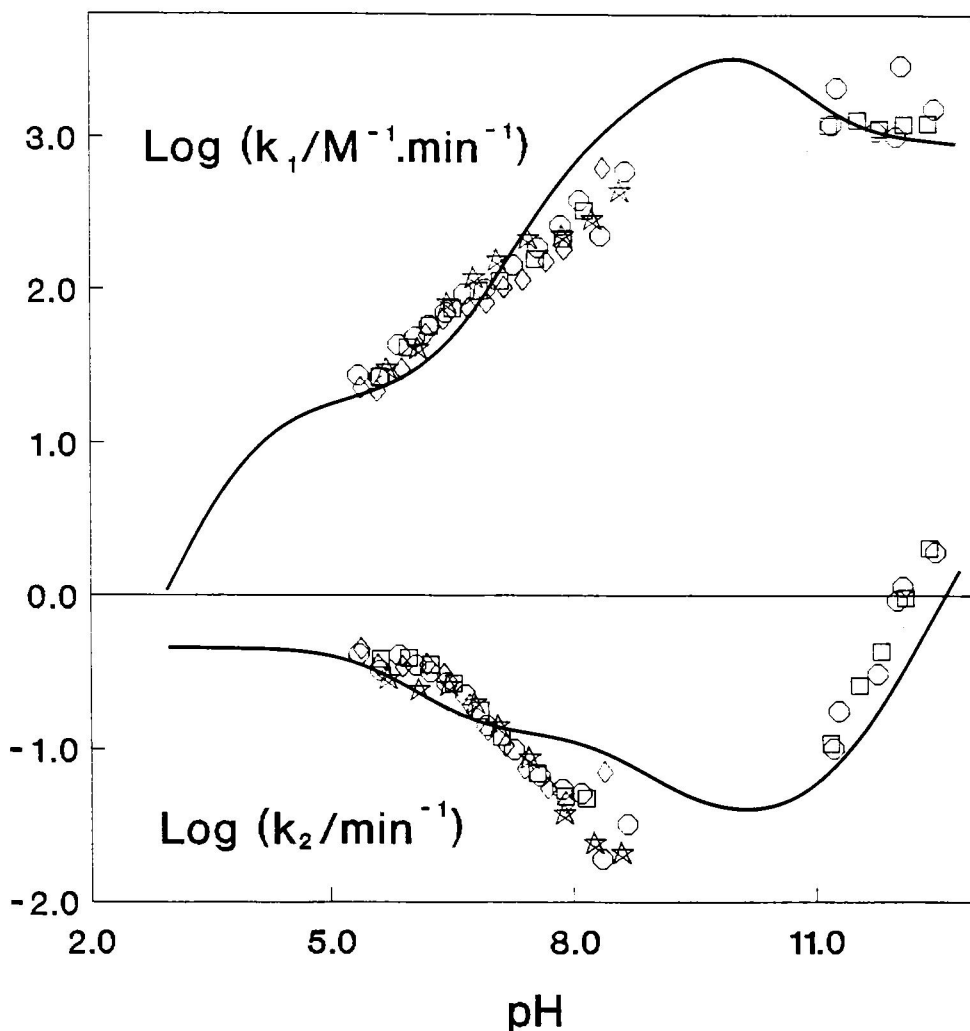


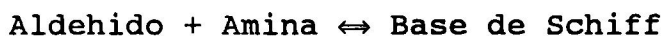
FIGURA 82. Efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas a partir de las valoraciones potenciométricas de una disolución de PLP + n-hexilamina + base de Schiff, utilizando el método descrito en la sección 6, en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a 25 °C. Los símbolos son los puntos experimentales de las valoraciones correspondientes a las de la figura 16 como sigue: ☆ =  $c_1$ , ○ =  $c_2$ , ◻ =  $c_3$  y ◊ =  $c_4$ . (—) curva predicha por las ecuaciones 132 y 136 (sección 5. 3.) para  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente, utilizando las constantes cinéticas individuales obtenidas por medidas espectrofotométricas a fuerza iónica 0.01 (tabla 4).



## 7. DISCUSSION



En este trabajo se ha puesto a punto un método potenciométrico que permite obtener, de una forma relativamente rápida, las constantes de equilibrio de ionización y de formación de bases de Schiff mediante una valoración potenciométrica del sistema en equilibrio (ver Sección 4.1):



Asimismo, se han determinado constantes cinéticas de formación e hidrólisis de bases de Schiff utilizando un método de análisis de los valores de  $k_{ap}$  (constante aparente de pseudo primer orden) que permite obtener, trabajando en ausencia de tampón, los perfiles de  $k_1$  (constante cinética de formación de segundo orden) y  $k_2$  (constante cinética de hidrólisis de pseudo primer orden) frente al pH (sección 5). Esta metodología se ha aplicado a la base de Schiff formada entre el PLP y la n-hexilamina en mezclas agua-dioxano.

Un hecho que apoya la corrección del método potenciométrico utilizado en la determinación de las constantes de ionización y de equilibrio de formación es la coincidencia de los valores de  $k_1$  y  $k_2$  (figuras 64-67) calculados a partir de valores de  $k_{ap}$  obtenidos a diferente concentración de amina (figuras 60-63), ya que estas constantes cinéticas se han determinado utilizando las constantes de ionización y de equilibrio de formación obtenidas previamente

(ecuaciones 125 y 126). Esta coincidencia también apoya la validez del procedimiento de análisis de datos empleado en los experimentos cinéticos, e indica claramente que:

1. No existe catálisis básica general por la amina. Si ésta tuviera lugar  $k_1$  y  $k_2$  serían funciones lineales de la concentración de amina  $c_{a0}$ :

$$k_1 = k'_1 + k''_1 \cdot c_{a0} \quad (163)$$

$$k_2 = k'_2 + k''_2 \cdot c_{a0} \quad (164)$$

y, siguiendo un procedimiento análogo al utilizado para llegar a la ecuación 117,  $k_{ap}$  vendría dada por:

$$k_{ap} = k'_2 + (k''_2 + k'_1) \cdot c_{a0} + k''_1 \cdot c_{a0}^2 \quad (165)$$

Lo relevante de esta ecuación es que posee un término en  $c_{a0}^2$  y esto indicaría una variación cuadrática para  $k_{ap}$  con  $c_{a0}$ . Si esto fuera así el procedimiento utilizado para calcular  $k_1$  y  $k_2$  no nos daría como resultado los mismos valores de estas constantes para experimentos realizados a diferente  $c_{a0}$ .

2. No existe acumulación de la carbinolamina intermedia. Se admite generalmente (Jencks, 1969) que la formación de bases de Schiff transcurre en dos etapas: a) ataque de la amina no protonada sobre el aldehído para dar lugar a una carbinolamina intermedia; b) deshidratación de la carbinolamina para dar lugar a la base de Schiff. Usualmente, la carbinolamina se encuentra en cantidades muy pequeñas y no es detectable. Puede demostrarse



(Palmer y Jencks, 1980), que si el intermedio se encontrase en concentración significativa en el transcurso de la reacción (acumulación de la carbinolamina), la dependencia de la constante aparente de pseudo primer orden,  $k_{ap}$ , con la concentración de amina vendría descrita por:

$$k_{ap} = k_2 + \frac{k_1 \cdot c_{a0}}{1 + K_f \cdot c_{a0}} \quad (166)$$

donde  $k_2$  es la constante cinética de hidrólisis de la base de Schiff para producir la carbonilamina intermedia y,

$$k_1 = K_f \cdot k_3 \quad (167)$$

siendo  $K_f$  la constante de equilibrio de formación de la carbinolamina a partir de aldehído+amina y  $k_3$  la constante cinética de formación de la base de Schiff a partir de la carbinolamina. Evidentemente si  $k_{ap}$  siguiera la variación predicha por la ecuación 164 no habríamos obtenido valores de  $k_1$  y  $k_2$  iguales para distintas  $c_{a0}$  aplicando nuestro método.

\* \* \*

Un factor muy importante a tener en cuenta cuando se realizan ajustes no lineales de mínimos cuadrados de funciones complicadas, en las que intervienen un elevado número de parámetros de ajuste (secciones 3., 4. y 5.), es la sensibilidad del ajuste al valor de los parámetros. Podría suceder, por ejemplo, que algunos parámetros apenas afectasen la bondad del ajuste, o que existieran

fuertes correlaciones entre ellos, de manera que conjuntos de parámetros muy distintos condujeran a ajustes similares.

Bevington (1969) ofrece un método, en parte empírico, pero aceptable para estimar el error estándar con que se ha determinado el valor de un parámetro en el ajuste.

El procedimiento descrito por Bevington y utilizado por nosotros es el siguiente:

1. Se realizan ajustes fijando el parámetro, cuyo error se pretende estimar, en el valor  $P_0 + \Delta p$ , siendo  $P_0$  el valor del parámetro correspondiente al mejor ajuste.

2. Se construye la curva de  $U/U_0$  (siendo  $U$  y  $U_0$  la suma de cuadrados de desviaciones de los ajustes realizados modificando el parámetro en  $\Delta p$  y del ajuste óptimo, respectivamente) frente a  $\Delta p$ . Las curvas obtenidas de esta manera tienen forma aproximadamente parabólica (con un cierto grado de asimetría) con un mínimo que, obviamente, corresponde a  $\Delta p = 0$ , es decir, al valor óptimo del parámetro (figuras 83-92). El que la "parábola" sea más o menos aguda ya ofrece una idea intuitiva de la sensibilidad del ajuste a ese parámetro concreto.

3. El error del parámetro se estima de los puntos de corte de la curva  $U/U_0$  versus  $\Delta p$  con la recta paralela al eje de abscisas  $N-n+1/N-n$  (siendo  $N$  el número de puntos y  $n$  el de parámetros ajustables) (figuras 83-92). Nótese que el error del parámetro determinado de esta forma incluye las posibles correlaciones que puedan existir entre parámetros ya que la curva se ha obtenido, para cada parámetro, fijando éste en valores distintos y dejando variar todos los demás hasta conseguir un nuevo ajuste, el mejor en las nuevas condiciones. Este método, por tanto, es superior a

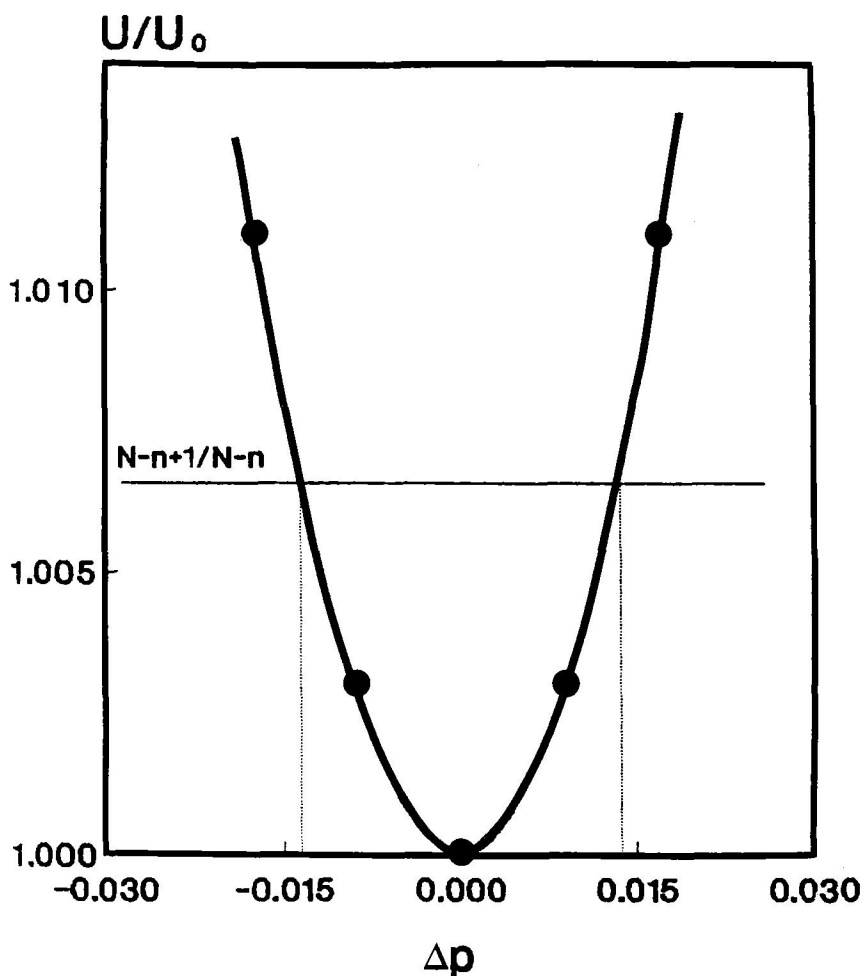


FIGURA 83. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_{2p}$  en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

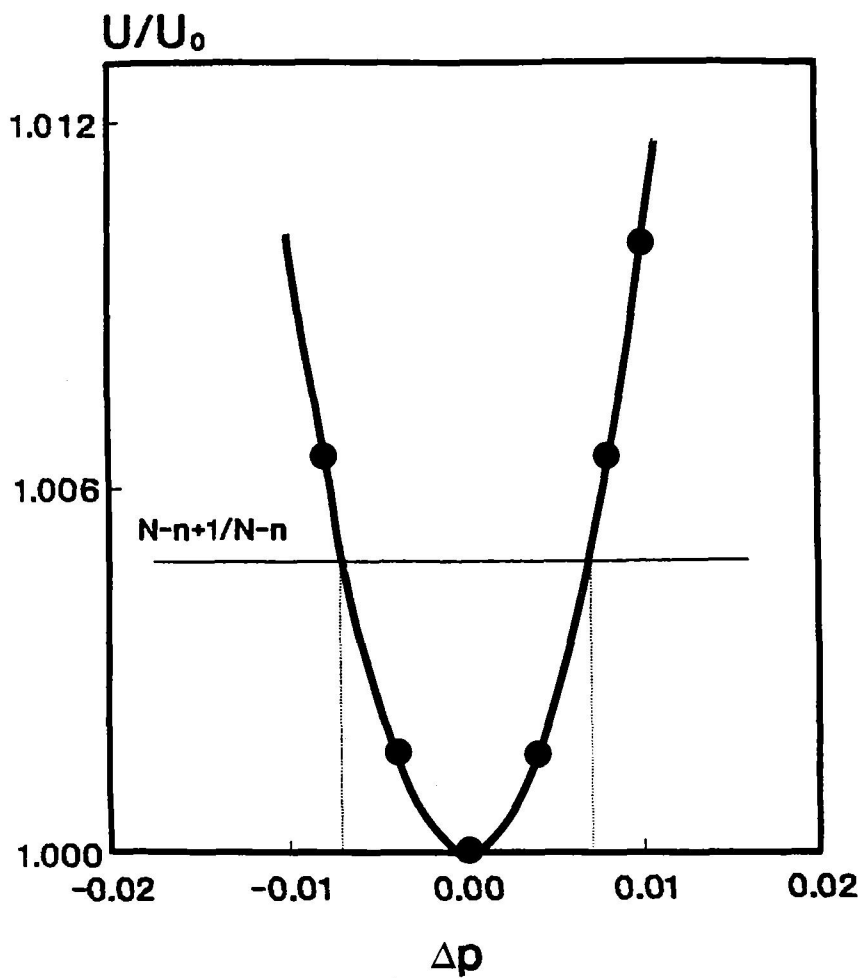


FIGURA 84. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_{3p}$  en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano.

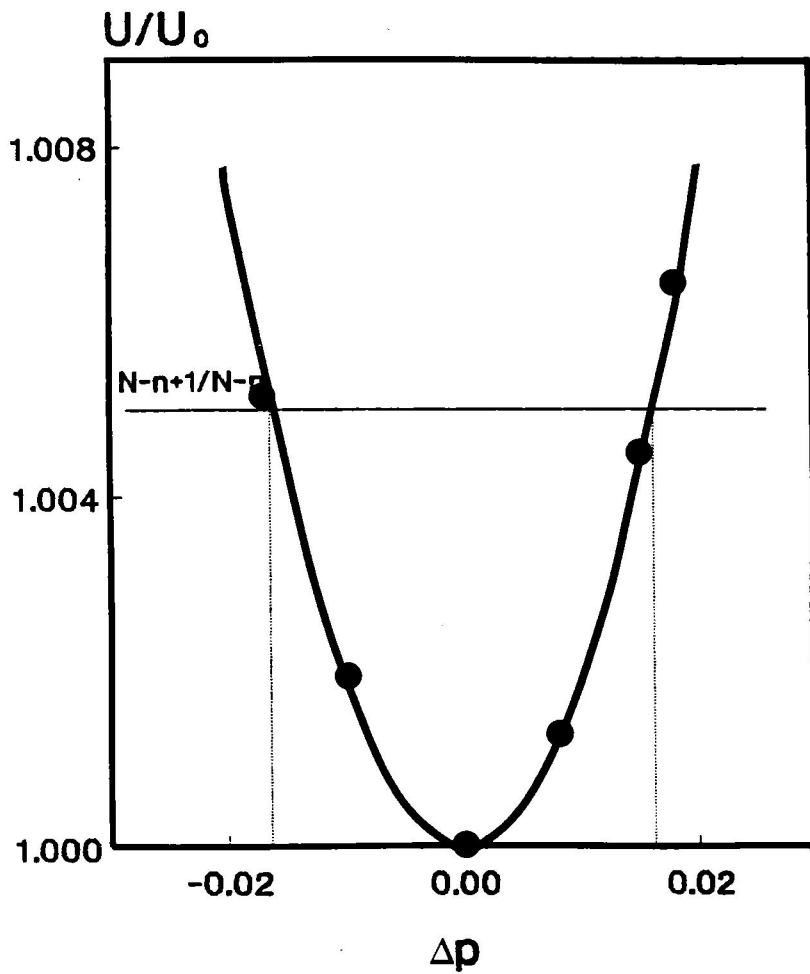


FIGURA 85. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_{4p}$  en agua pura.

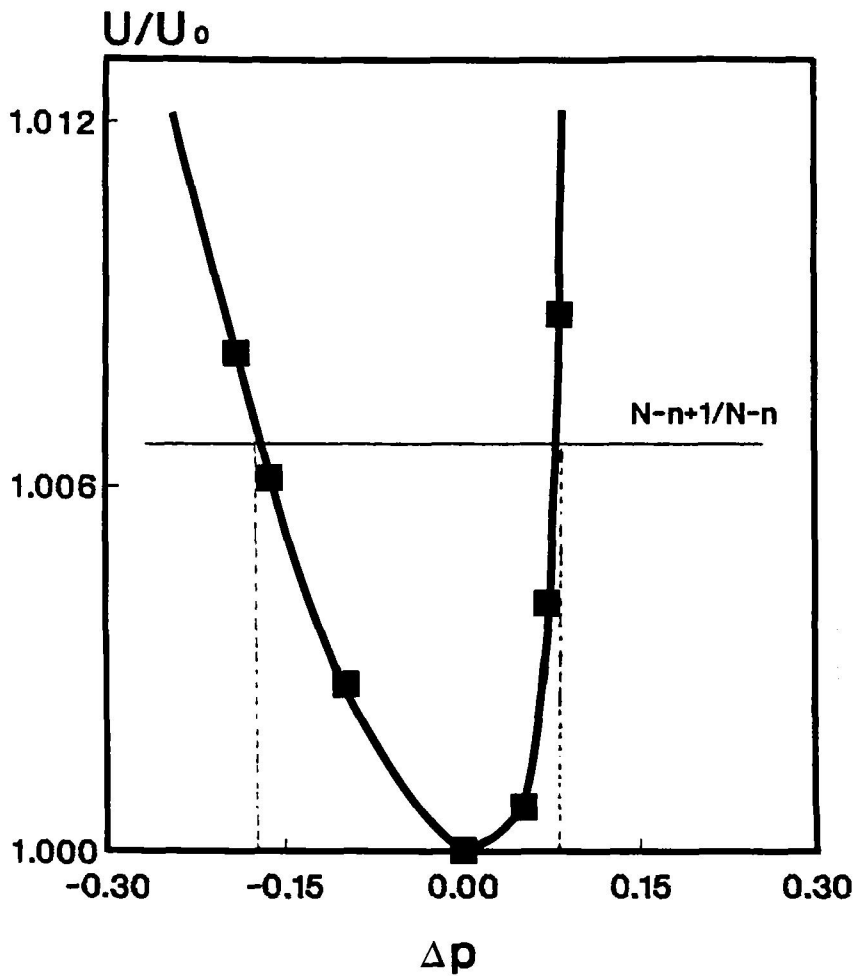


FIGURA 86. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_{1b}$  en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano.

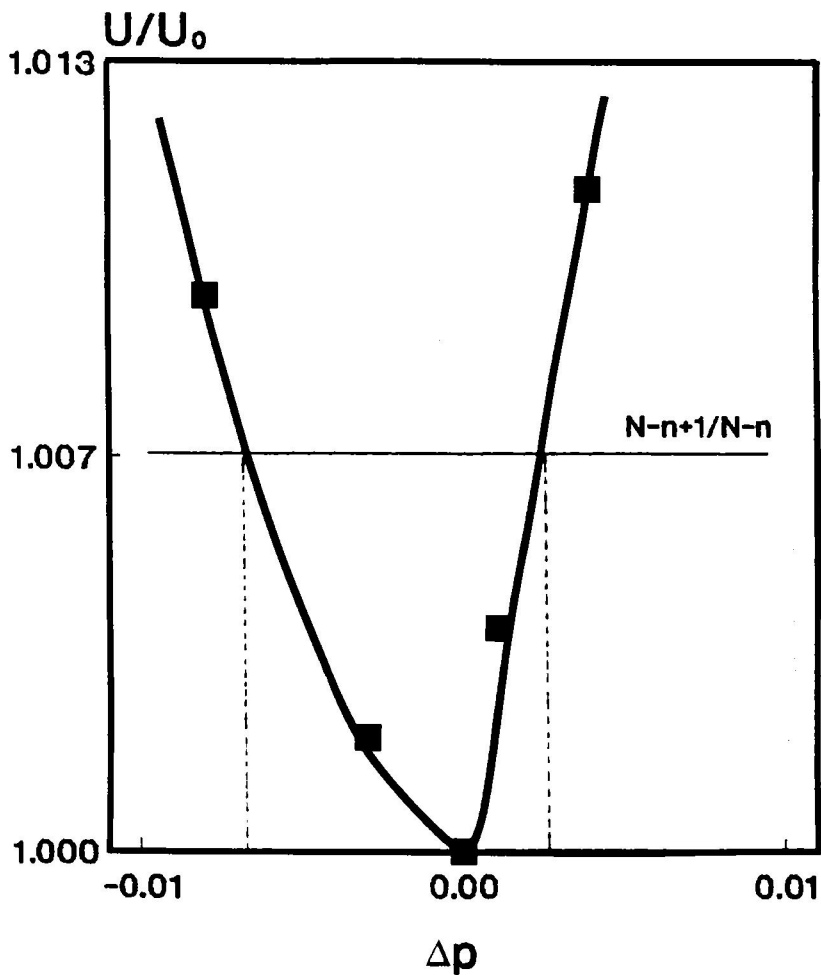


FIGURA 87. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_{2b}$  en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

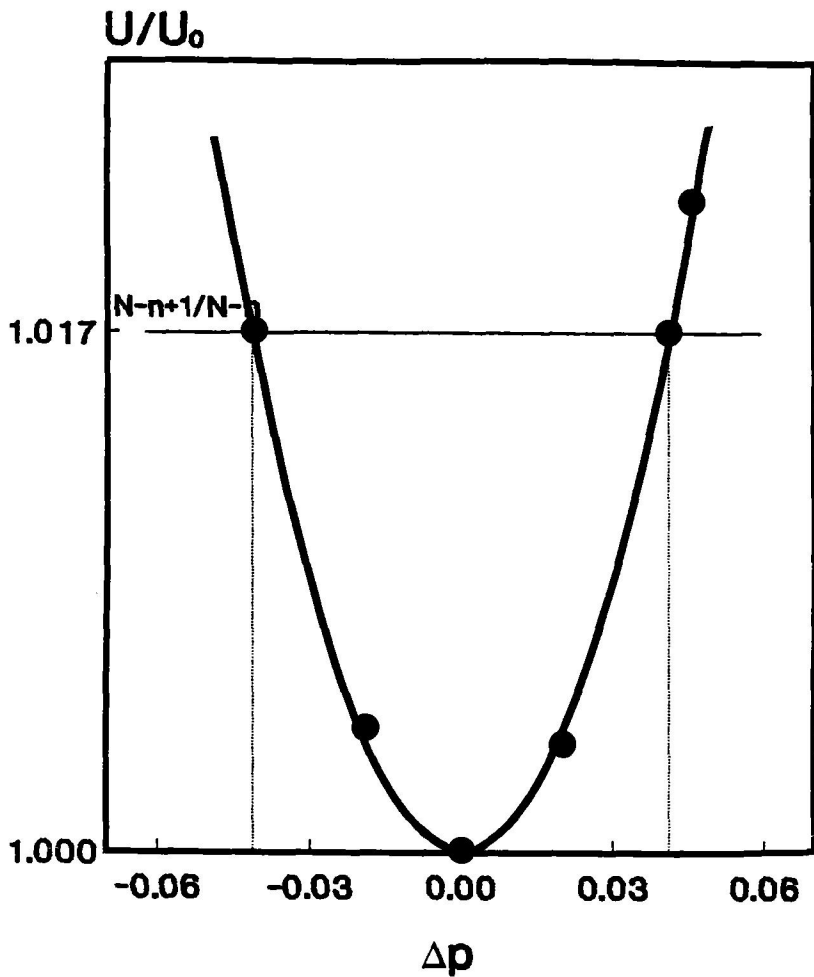


FIGURA 88. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_H$  en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano.



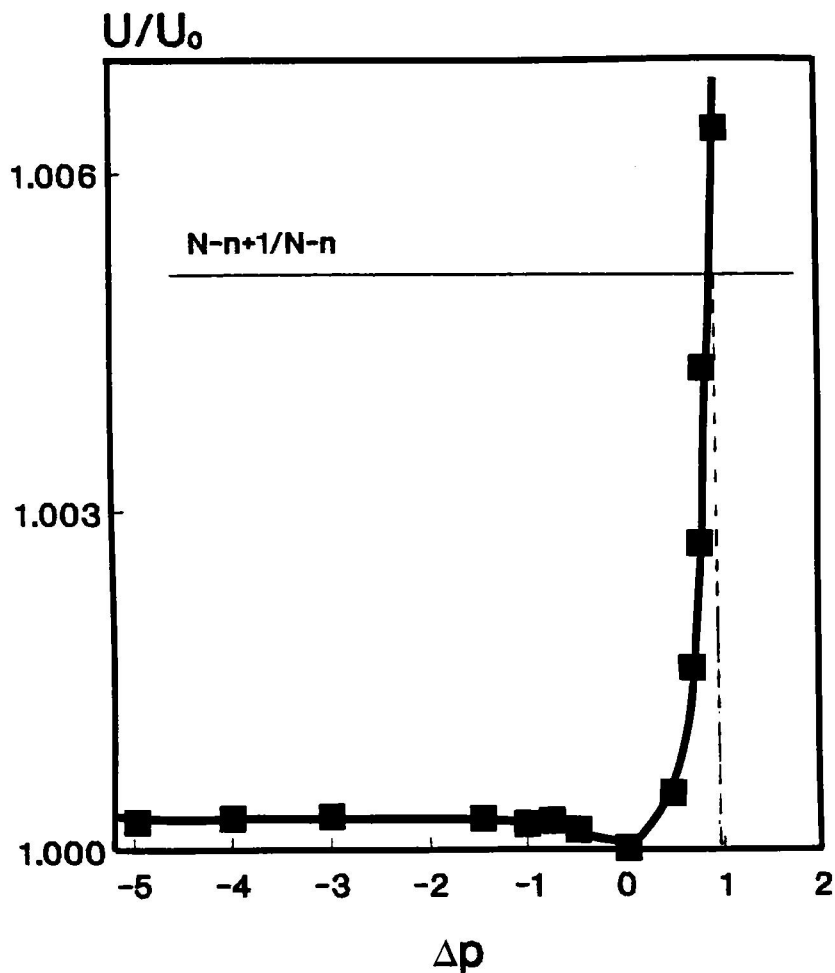


FIGURA 89. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $pK_{1b}$  en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano.

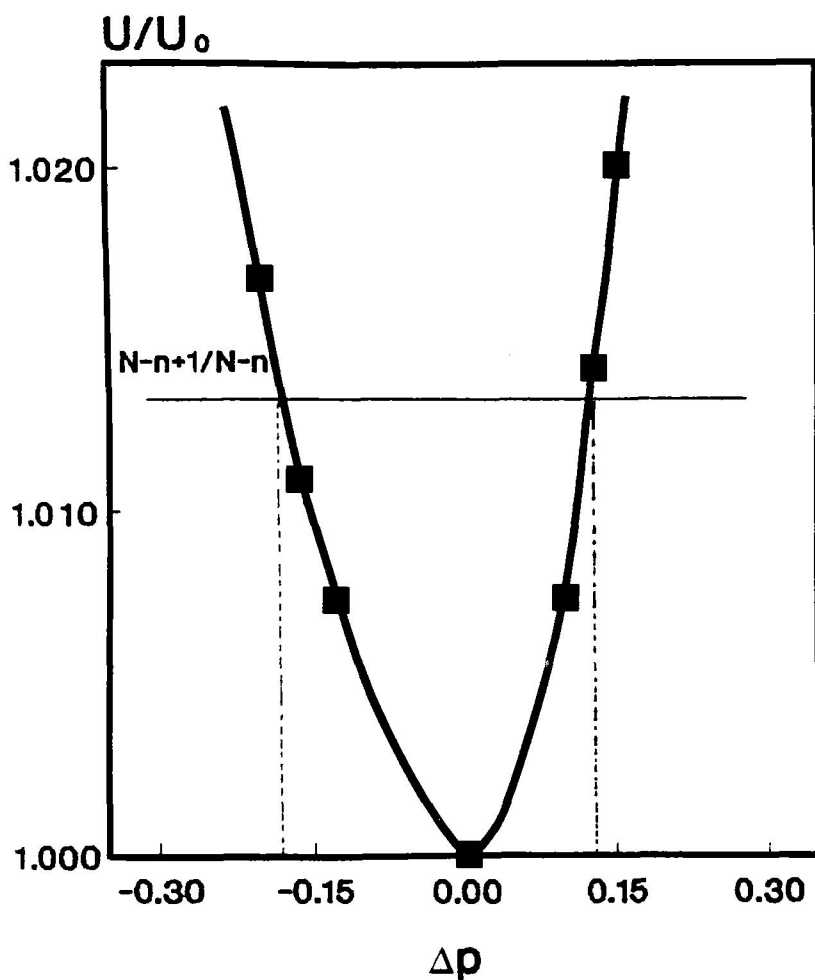


FIGURA 90. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $\log k_1^0$  en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano.

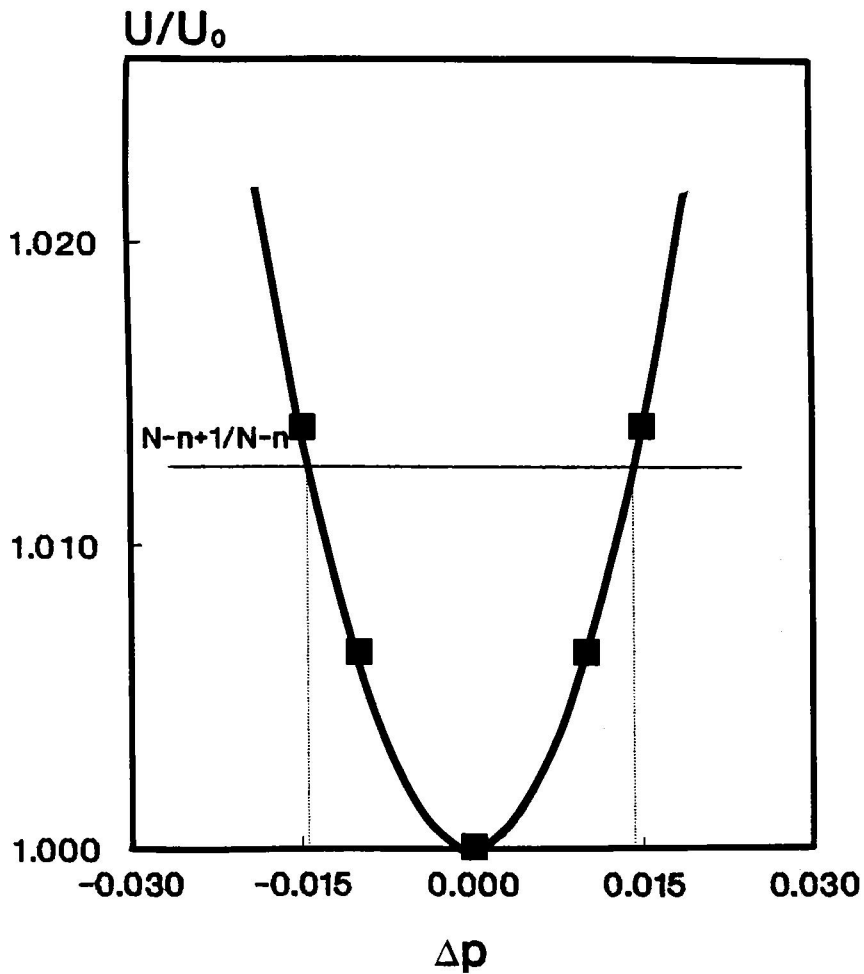


FIGURA 91. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $\log k_2^1$  en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano.

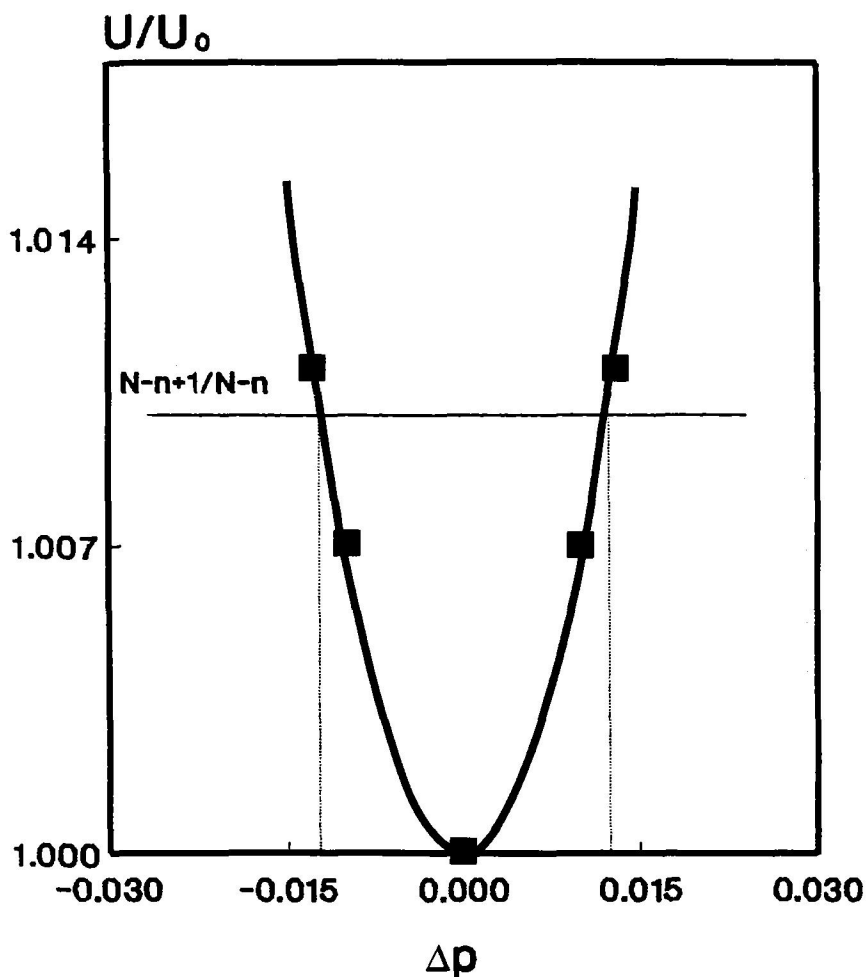


FIGURA 92. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado con  $P_0 + \Delta p$  en relación a la del ajuste óptimo frente a  $\Delta p$ . En este caso el parámetro es  $\log k_2^3$  en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

otros utilizados habitualmente, tal como el cálculo de errores estándar a partir de los elementos diagonales de la matriz de covarianza (Froser y Suzuki, 1973). Es importante notar, en cualquier caso, que el método de Bevington (u otros análogos) no proporciona el intervalo de error total de los parámetros, sino que, simplemente ofrece una indicación sobre hasta que punto está el parámetro bien determinado a partir del ajuste no lineal de mínimos cuadrados (o sea, en que grado el ajuste es sensible a la modificación del parámetro). Por esta razón, nos referiremos a los intervalos calculados como intervalos de Bevington, entendiendo que el error real de los parámetros puede ser mayor.

Hemos calculado los intervalos de Bevington para todos los parámetros obtenidos en este trabajo mediante ajustes no lineales de mínimos cuadrados (constantes de equilibrio de ionización del PLP y de la base de Schiff, constante de equilibrio de formación,  $K_M$ , de la base de Schiff y constantes cinéticas individuales de formación e hidrólisis de la base de Schiff).

En las figuras 83-92 se muestran algunos ejemplos de curvas  $U/U_0$  versus  $\Delta p$  y en las tablas 5-8 los intervalos de Bevington para cada parámetro en todas las mezclas agua-dioxano estudiadas.

Se observa que los ajustes son muy sensibles a todos los parámetros determinados, lo cual apoya la corrección de los métodos empleados para determinar constantes de equilibrio de ionización del PLP (sección 3.) y de ionización y de formación de la base de Schiff (sección 4. 1.) y constantes cinéticas individuales de formación e hidrólisis (sección 5).

Para los valores de pK del PLP (tabla 5) y la base de Schiff (tabla 6), los intervalos de Bevington son claramente menores de

TABLA 5. Intervalo de Bevington para los valores de  $pK_{ip}$  en mezclas agua-dioxano.

$\Phi_D$	$pK_{2p}$	$pK_{3p}$	$pK_{4p}$
0	3.713 - 3.727	6.478 - 6.512	8.896 - 8.929
0.2	3.869 - 3.884	7.147 - 7.161	9.181 - 9.195
0.4	3.960 - 4.006	7.946 - 7.990	9.166 - 9.210
0.6	3.944 - 3.974	8.884 - 8.912	11.277 - 11.304

TABLA 6. Intervalo de Bevington para  $pK_{1b}$  y  $pK_M$  en mezclas agua-dioxano.

$\Phi_D$	$pK_{1b}$	$pK_{2b}$	$-pK_M$
0	5.740 - 5.850	6.866 - 6.868	14.654 - 14.640
0.2	5.729 - 5.979	7.223 - 7.321	14.739 - 14.713
0.4	—— 6.29*	7.778 - 7.938	15.332 - 15.277
0.6	5.665 - 5.875	9.423 - 9.432	16.826 - 16.803

\* Ver texto.

TABLA 7. Intervalo de Bevington para  $\log k_1^1$  en mezclas agua-dioxano.

$\Phi_D$	$\text{Log } k_1^0$	$\text{Log } k_1^1$	$\text{Log } k_1^2$	$\text{Log } k_1^3$
0	3.733 - 3.777	4.631 - 4.655	5.960 - 5.978	7.759 - 7.775
0.2	2.964 - 3.254	4.703 - 4.733	5.541 - 5.562	7.224 - 7.240
0.4	—————	4.440 - 4.470	5.282 - 5.302	6.803 - 6.825
0.6	2.926 - 2.992	4.060 - 4.162	5.093 - 5.125	7.294 - 7.316



TABLA 8. Intervalo de Bevington para  $\log k_2^1$  y  $\log k_2^{\text{OH}}$  en mezclas agua-dioxano.

$\Phi_D$	$-\log k_2^1$	$-\log k_2^2$	$-\log k_2^3$	$\log k_2^{\text{OH}}$
0	0.969 - 0.947	0.251 - 0.233	0.610 - 0.594	3.239 - 3.289
0.2	0.923 - 0.893	0.400 - 0.380	0.595 - 0.579	3.001 - 3.270
0.4	0.895 - 0.865	0.443 - 0.423	0.518 - 0.490	—————
0.6	1.536 - 1.436	0.884 - 0.854	0.341 - 0.317	3.809 - 3.889

0.1, excepto en el caso de la constante  $pK_{1b}$  de la base de Schiff. En la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano no pudo, de hecho, calcularse el límite inferior del intervalo, ya que para valores de  $pK_{1b} < 5.35$  los ajustes son siempre buenos, muy próximos al óptimo (ver figura 89). Evidentemente, esto indica que este parámetro no está bien determinado en el ajuste. Como se puede observar en la figura 38 esta mezcla es precisamente la que presenta valores más bajos de la constante de equilibrio aparente a pH ácido con lo cual el equilibrio está muy poco desplazado hacia la formación de base de Schiff, es decir, la fracción de la especie iónica  $B_3$  referida a la concentración total (suma de concentraciones totales de PLP y base de Schiff) es muy pequeña a estos valores de pH (figuras 24.a-24.e). Por lo tanto, la no determinación de  $K_{1b}$  en la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano (el valor obtenido en el ajuste óptimo, 5.35, lo consideraremos como una estimación) es consecuencia de la baja concentración de la especie iónica  $B_3$  a estos valores de pH. (Observe que en el resto de las mezclas agua-dioxano estudiadas (0, 0.2 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano) no existe este problema ya que en todos los casos la fracción de la especie  $B_3$  es bastante mayor o, por lo menos, suficiente para que no se presente este problema (figuras 22.a-22.e, 23.a-23.d y 25.a-25.d)).

Respecto a las constantes cinéticas individuales de formación e hidrólisis de la base de Schiff (tablas 7 y 8 y figuras 90-92) los intervalos de Bevington son también muy pequeños. Debe notarse que en el cálculo, mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados, de las constantes cinéticas individuales (sección 5.) los pK de la base de Schiff y del PLP se mantuvieron fijos en los valores

obtenidos potenciométricamente (tabla 2). Resulta, por tanto, conveniente estimar el efecto que sobre los valores calculados de las constantes cinéticas individuales, tiene el error de las constantes de ionización. A este efecto, hemos llevado a cabo ajustes de las ecuaciones 132 y 136 a los datos de  $k_1/\text{pH}$  y  $k_2/\text{pH}$ , pero fijando los valores de pK en  $\text{pK óptimo} \pm 0.2$ . Los nuevos valores de  $\log k_1^1$ ,  $\log k_2^1$  y  $\log k_2^{\text{OH}}$  han estado siempre dentro del intervalo de Bevington calculado previamente para estos parámetros (tablas 7 y 8), con lo cual podemos concluir, que un error real de  $\pm 0.2$  en los valores de pK correspondientes no produce grandes cambios en los valores de las constantes cinéticas individuales. En el caso de los datos de  $k_2/\text{pH}$  hemos hecho otros ajustes adicionales fijando  $\text{pK}_{1b}$  en  $\text{pK}_{1b} \text{ óptimo} \pm 0.5$ , ya que este pK es el que presenta el mayor intervalo de Bevington (tabla 6). El resultado ha sido que, nuevamente, los valores de  $\log k_2^1$  y  $\log k_2^{\text{OH}}$  obtenidos están en la mayoría de los casos dentro del intervalo de Bevington estimado para ellos. Sólo en algún caso ( $\log k_2^2$  y  $\log k_2^1$  en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano y  $\log k_2^1$  en agua pura) el valor obtenido se ha encontrado fuera de este intervalo pero las diferencias entre el nuevo valor y el óptimo nunca han sido mayores de 0.1. Por supuesto, el procedimiento que hemos utilizado no puede considerarse riguroso, pero indica claramente que los valores calculados para las constantes cinéticas individuales no deben estar fuertemente afectados por posibles errores en las constantes de ionización.

\* \* \*

En la figura 93 se representa el efecto del disolvente sobre las constantes de ionización determinadas para el PLP y su base de Schiff con n-hexilamina. Hay que notar que las especies iónicas del PLP y la base de Schiff están constituidas por una mezcla de formas moleculares (Metzler et al., 1980; Sánchez-Ruiz, et al., 1984a; Cortijo et al., 1988) debido a la posibilidad de tautomerización y, en el caso del PLP, de hidratación del grupo aldehído. Por tanto, las constantes de ionización de la figura 93 son constantes macroscópicas que no pueden asignarse a ningún grupo químico concreto. En el caso del PLP, Cortijo et al. (1988) calcularon las constantes de ionización microscópicas (correspondientes a grupos químicos concretos) a partir de las macroscópicas y de la información previamente obtenida (Sánchez-Ruiz et al., 1984a y 1987; Llor et al., 1988) sobre los equilibrios de tautomerización e hidratación de esta sustancia en mezclas agua-dioxano. No se dispone, sin embargo, de este tipo de información para la base de Schiff, excepto en disolución acuosa (Metzler et al., 1980) y en agua-etanol (Blázquez et al., 1987 y 1989), por lo que no es posible el cálculo de las constantes de ionización microscópicas en mezclas agua-dioxano.

Las formas moleculares de la base de Schiff que se encuentran significativamente pobladas en disolución acuosa se dan en el esquema 11 (Metzler et al., 1980). Las formas mayoritarias corresponden a tautómeros tipo cetoenamina, los cuales presentan carácter dipolar:

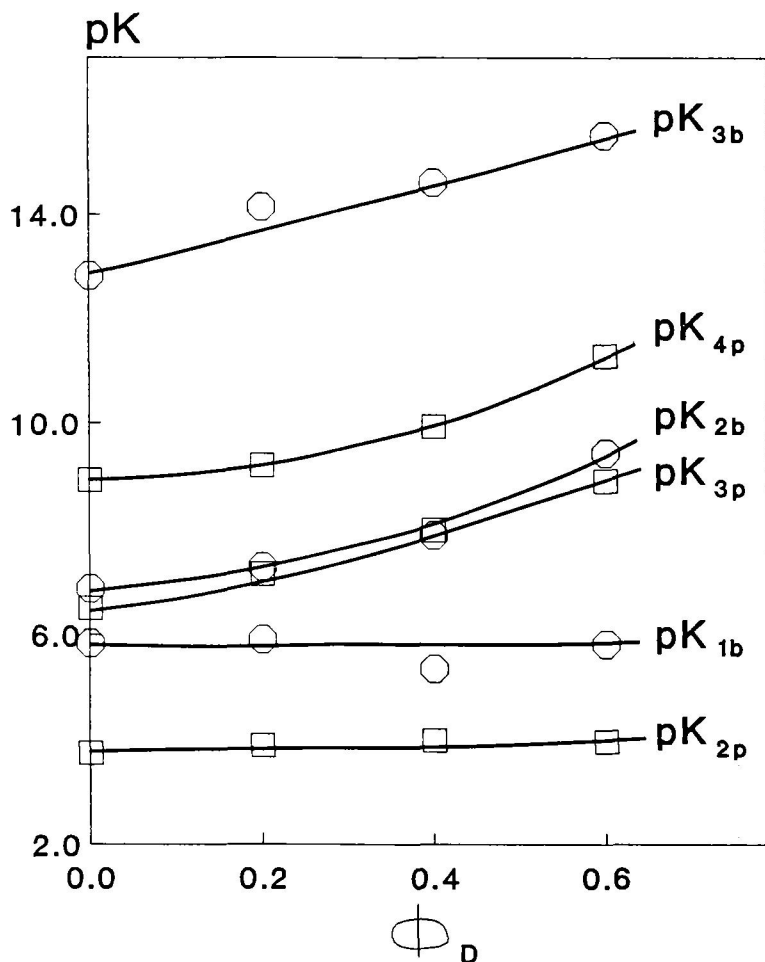
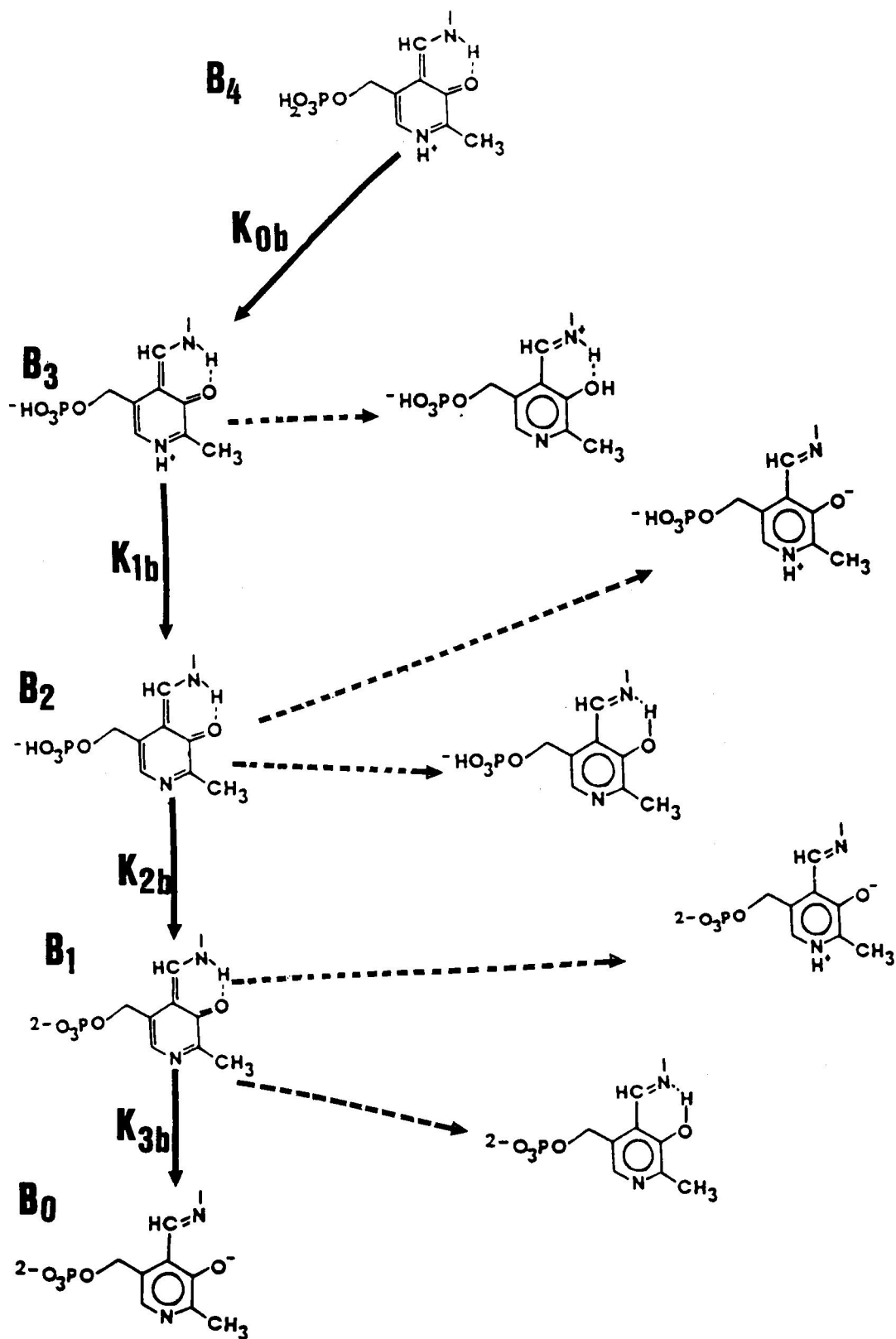
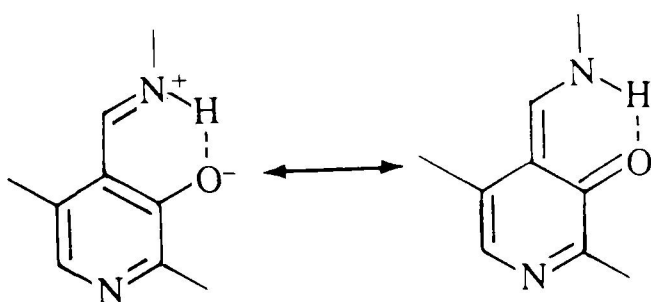


FIGURA 93. Efecto de la fracción en volumen de dioxano ( $\Phi_D$ ) sobre las constantes de equilibrio de ionización macroscópicas del PLP y de su base de Schiff con n-hexilamina. (□) valores de  $pK_{1p}$  obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas de PLP (sección 3.4., tabla 1). (o) valores de  $pK_{1b}$  y  $pK_{2b}$  obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas del sistema PLP + n-hexilamina + base de Schiff en equilibrio (sección 4.1.4., tabla 2) y de  $pK_{3b}$  obtenidos a partir de las valoraciones espectrofotométricas del mismo sistema (sección 4.2.4., tabla 3).

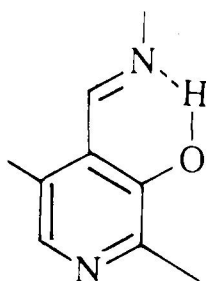


ESQUEMA 11



ESQUEMA 12

aunque cabe esperar que en disolventes de baja polaridad (alta fracción de dioxano) estén favorecidos los tautómeros tipo enolimina (Llor y Cortijo, 1977):

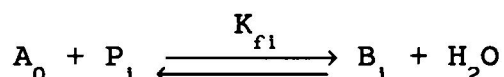


El valor de  $pK_{3b}$  es muy alto (figura 93) atribuyéndose este pK en disolución acuosa a la disociación del protón fuertemente unido al grupo imina del tautómero cetoenamina, aunque parece plausible esperar que, en las mezclas más ricas en dioxano el  $pK_{3b}$  corresponda a la disociación del grupo fenol del tautómero enolimina.

Igualmente, en disolución acuosa, las constantes  $pK_{2b}$  y  $pK_{1b}$  se asignan a la ionización del grupo fosfato y del nitrógeno piridínico, respectivamente. (ver esquema 11). Es interesante notar que, en todas las mezclas agua-dioxano estudiadas, el valor

de  $pK_{2b}$  es muy similar al de  $pK_{3p}$  (figura 93), el cual corresponde fundamentalmente a la ionización del grupo fosfato del PLP en todas las mezclas agua-dioxano (Sánchez-Ruiz, et al., 1984a; Cortijo et al., 1988); es plausible, por tanto, asignar también la constante  $pK_{2b}$  a la ionización de este grupo en la base de Schiff independientemente del contenido en dioxano del disolvente.

En la figura 94 se representa el efecto del disolvente sobre las constantes individuales de formación de base de Schiff del PLP:  $K_{fi}$ . Estas constantes (calculadas a partir de las ecuaciones 36-38 y 77 y de los parámetros de las tablas 2 y 3) corresponden a la reacción de la n-hexilamina no protonada con la especie iónica del PLP con  $i$  protones lábiles para dar la correspondiente especie de la base de Schiff con el mismo número de protones lábiles:



Estas constantes están definidas sin incluir la concentración (o actividad) de agua como:

$$K_{fi} = \frac{a_{bi}}{a_{pi} \cdot a_{a0}} \quad (168)$$

donde  $a_{bi}$ ,  $a_{pi}$  y  $a_{a0}$  son las actividades de las especies iónicas de la base de Schiff y de PLP con  $i$  protones lábiles y de la especie sin protonar de la n-hexilamina, respectivamente. Nótese que se trata de constantes macroscópicas, ya que las especies iónicas del PLP y la base de Schiff son, en realidad, una mezcla



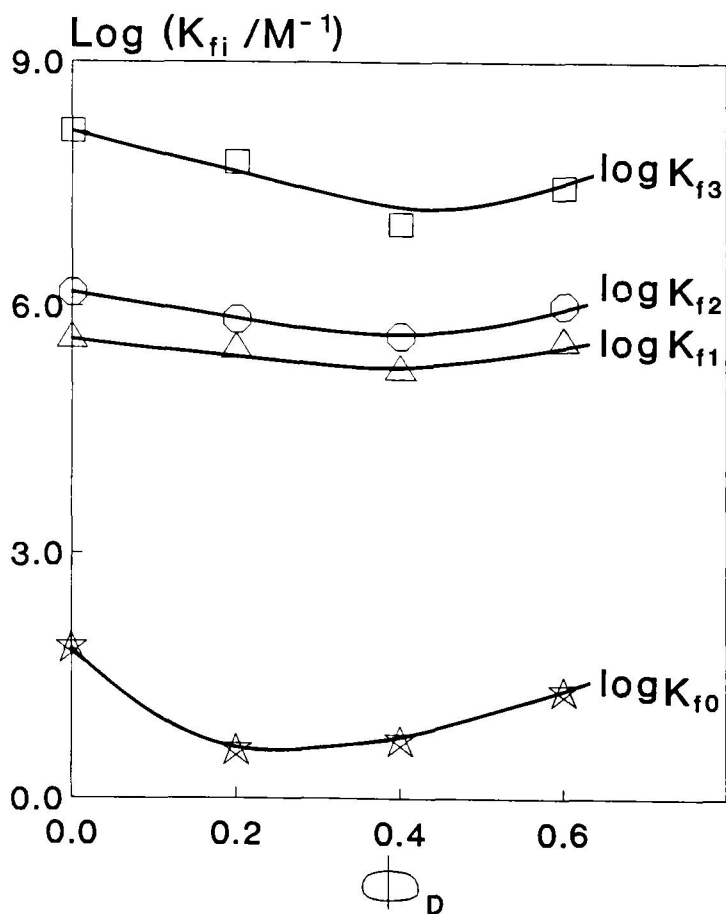


FIGURA 94. Efecto de la fracción en volumen de dioxano ( $\Phi_D$ ) sobre las constantes de formación individuales de la base de Schiff con i protones lábiles a partir del PLP con el mismo número de protones y de la especie iónica de la n-hexilamina sin protonar. Estas constantes se han calculado a partir de las ecuaciones 36-38 y 77 y de los valores de  $pK_{ip}$ ,  $pK_{ib}$  y  $pK_M$  obtenidos en los ajustes (tablas 2 y 3, sección 4).

de distintas formas moleculares.

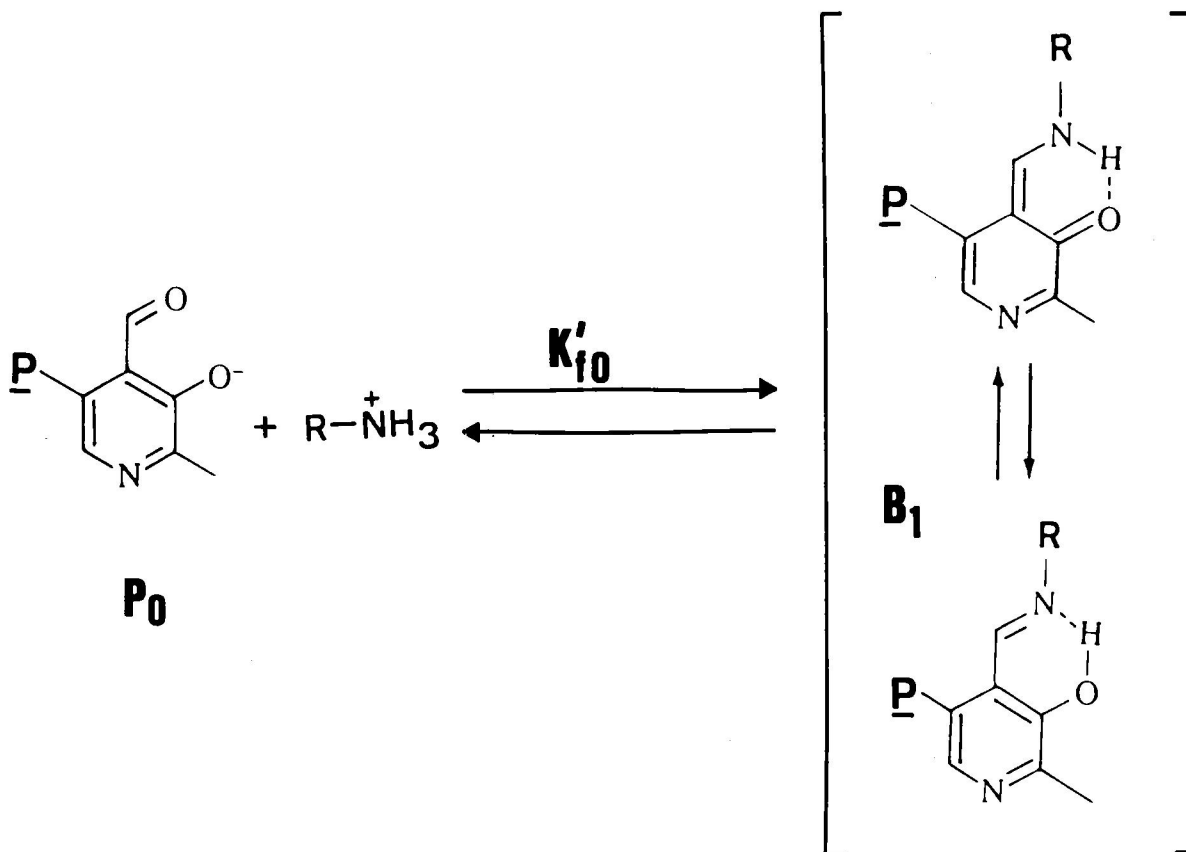
En todas las mezclas agua-dioxano estudiadas se observa un aumento en los valores de  $K_{f1}$  con el número de protones lábiles presentes, lo cual podría interpretarse como un aumento de las constantes con el carácter electrón atrayente del anillo. Conviene destacar, sin embargo, que el efecto de la adición del segundo protón es muy pequeño (compárese los valores de  $K_{f1}$  y  $K_{f2}$  en la figura 94); este hecho puede explicarse fácilmente si se tiene en cuenta que la adición de este segundo protón en la molécula de PLP (así como también en la de base de Schiff, de acuerdo con la suposición hecha anteriormente sobre la asignación del  $pK_{3b}$ ) corresponde a la protonación del grupo fosfato, la cual no debe tener influencia apreciable sobre el carácter electrón atrayente del anillo (Cortijo, et al., 1988).

Por lo que respecta al efecto del disolvente sobre los valores de  $K_{f1}$ , cabría esperar quizás un aumento con el contenido en dioxano, dado que en la definición de estas constantes no se incluye la concentración (o actividad) de agua. En realidad se observa una tendencia a la disminución, al menos desde agua hasta la mezcla de 0.4 de fracción en volumen de dioxano. Este resultado puede parecer sorprendente ya que los valores de la constante aparente,  $K_{pH}$ , aumentan claramente con el contenido en dioxano del disolvente, al menos a  $pH > 6$  (ver figura 55, pag. 154). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que  $K_{pH}$  viene dada por una expresión compleja en la que intervienen las constantes de ionización del PLP y la base de Schiff (ecuaciones 108 y 109 en pag. 152 y ecuaciones 18 y 49 en páginas 32 y 64, respectivamente) y el hecho de que, a un determinado  $pH$ , las especies significativamente

pobladas del PLP, la base de Schiff y la n-hexilamina pueden no corresponder a ninguna de las constantes  $K_{fi}$  definidas anteriormente. Así por ejemplo, a los valores de pH correspondientes al máximo de los perfiles de  $\log K_{pH}$  versus pH para las mezclas de fracción en volumen de dioxano 0 y 0.2, las especies mayoritarias son: la n-hexilamina protonada, el PLP sin protones lábiles y la base de Schiff con un protón lábil (figuras 51 y 52 en páginas 148 y 149). Por lo tanto la constante de equilibrio individual relevante en estas condiciones sería:

$$K'_{f0} = \frac{a_{b1}}{a_{p0} \cdot a_{a0}} \quad (169)$$

la cual corresponde al equilibrio:





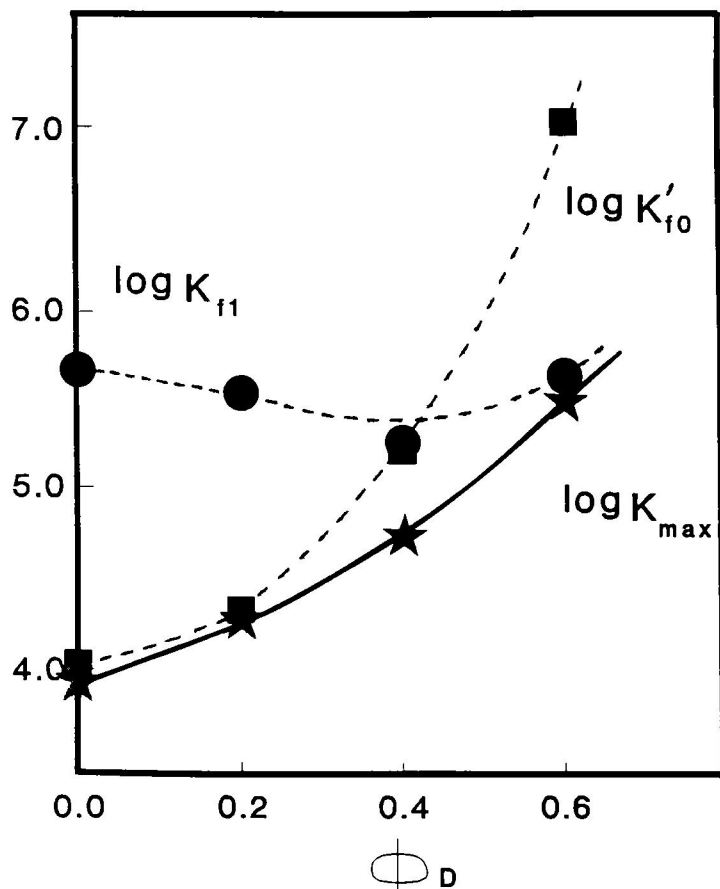


FIGURA 95. Efecto de la fracción en volumen de dioxano ( $\Phi_D$ ) sobre las constantes de formación  $K_{f1}$ ,  $K'_{f0}$  y  $K_{max}$ . Las dos primeras constantes se han calculado a partir de las ecuaciones 36 y 170, respectivamente, mientras que  $K_{max}$  se ha obtenido a partir de la figura 55.

A continuación pasaremos a discutir las constantes cinéticas individuales de formación de base de Schiff entre el PLP y la n-hexilamina (tabla 4.a). Tal como se observa en la figura 96, los valores de  $\log k_1^i$  tienden a disminuir al aumentar la fracción de dioxano en el disolvente; el efecto más espectacular es, sin embargo, el fuerte incremento de los valores de  $\log k_1^i$  con el número de protones lábiles presentes en la especie iónica correspondiente (es decir, con el superíndice i). Este efecto fue ya descrito en un trabajo previo sobre este sistema (n-hexilamina + PLP) en disolución acuosa (Sánchez-Ruiz et al., 1982) y se atribuyó a la existencia de catálisis ácida intramolecular en la reacción. Esta hipótesis vino apoyada por la excelente correlación existente entre los valores de  $\log k_1^i$  y los pK macroscópicos de las correspondientes especies iónicas del PLP; esta dependencia se interpretó, de hecho, como una correlación de Bronsted (es decir, como una representación de logaritmos de la constante de velocidad de una reacción catalizada por ácidos frente a los valores de pK de los catalizadores). En la figura 97 se muestra este tipo de representación para los datos obtenidos en este trabajo en mezclas agua-dioxano de fracciones en volumen de dioxano 0, 0.2, 0.4 y 0.6; parece claro que la fracción de dioxano en el disolvente no afecta significativamente a la catálisis ácida intramolecular. A conclusiones similares se ha llegado recientemente en estudios sobre sistemas relacionados: n-hexilamina + PLP en mezclas agua-etanol (García del Vado et al., 1988) y n-hexilamina + deoxipiridaxal en mezclas agua-dioxano (Vazquez, 1988).

En la figura 98.a se muestra una representación de Bronsted

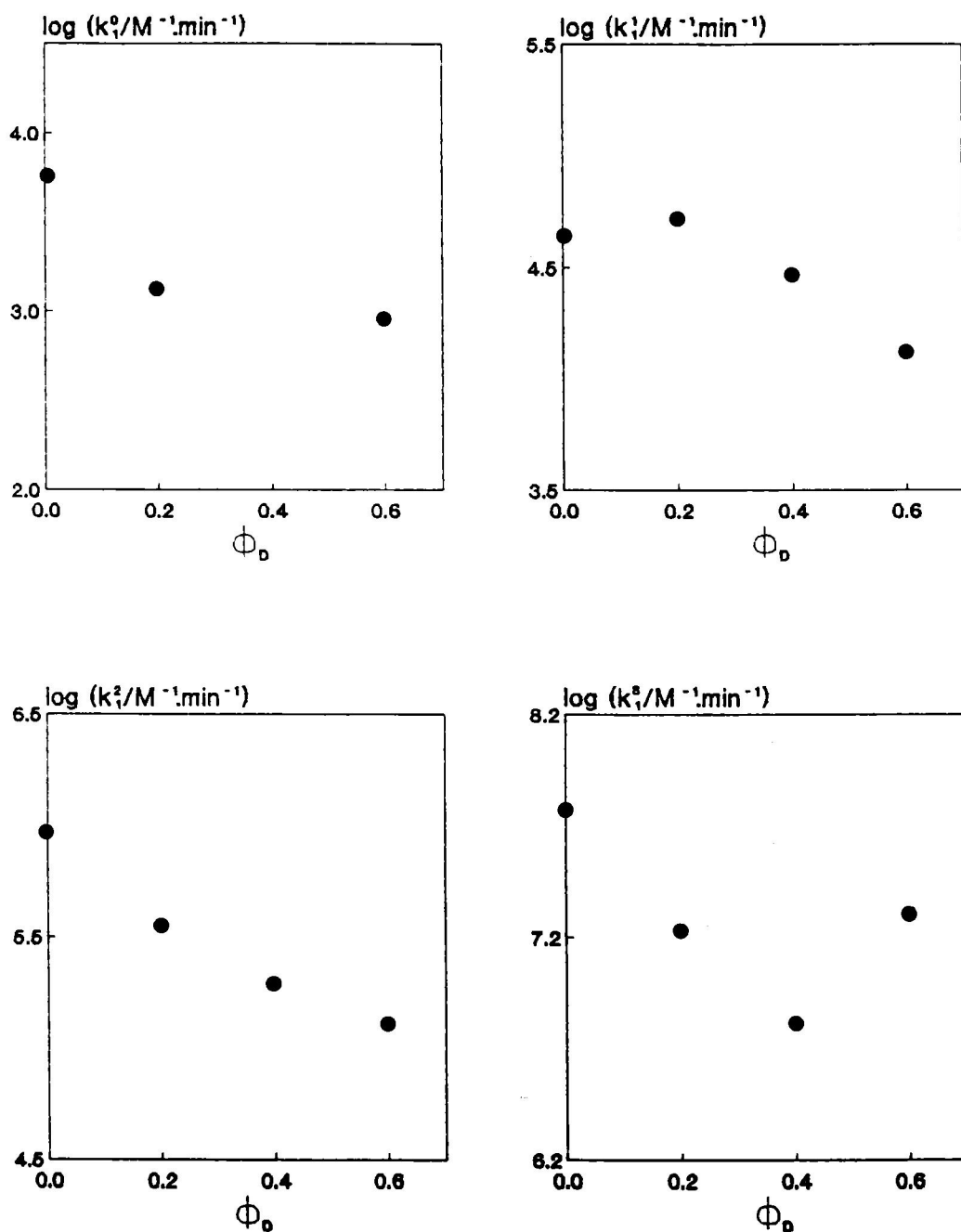


FIGURA 96. Efecto del disolvente sobre las constantes cinéticas individuales de formación de base de Schiff del PLP con n-hexilamina.  $\phi_D$  representa la fracción en volumen de dioxano de la mezcla.

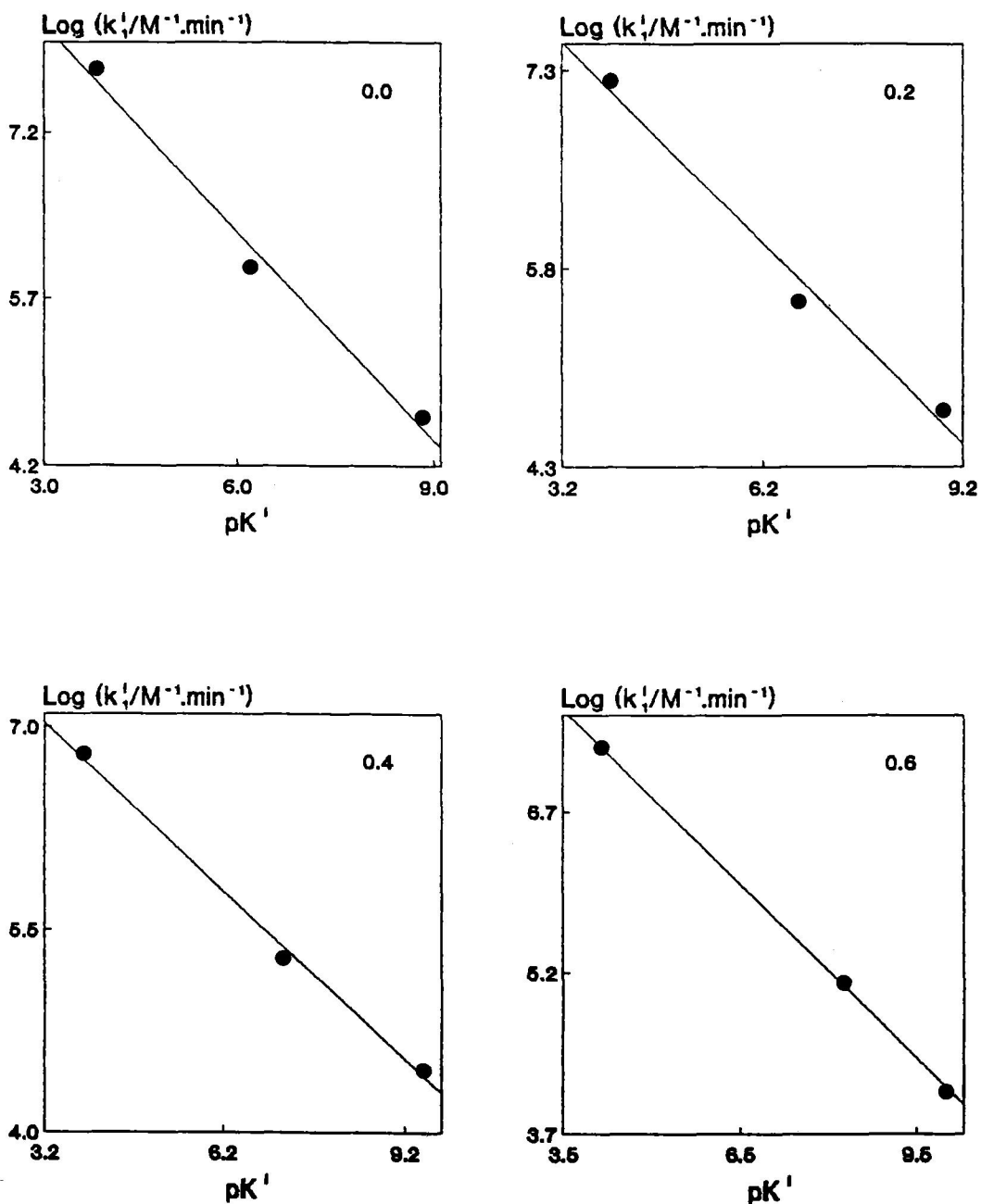


FIGURA 97. Correlación entre el logaritmo de la constante cinética de formación de la base de Schiff a partir de una especie del PLP con  $i$  protones lábiles ( $k_1'$ ) y el  $pK$  macroscópico de la especie ( $pK^1$ ). El número en la esquina superior derecha representa la fracción en volumen de dioxano.



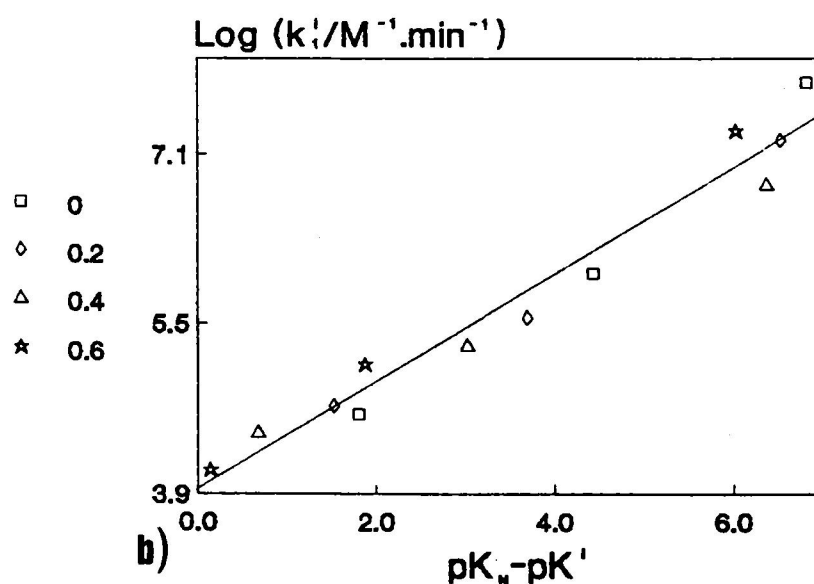
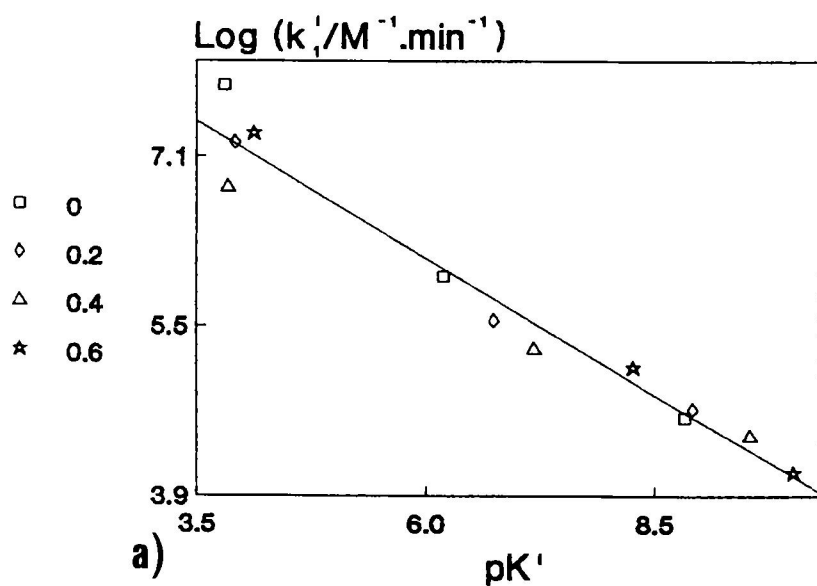
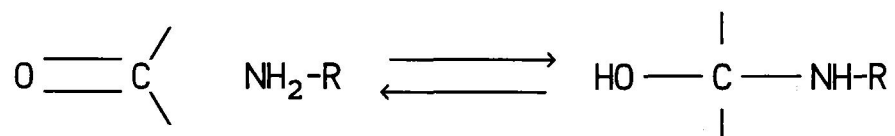


FIGURA 98. a) Correlación entre el logaritmo de la constante cinética de formación de la base de Schiff a partir de una especie del PLP con  $i$  protones lábiles ( $k_1^i$ ) y el  $pK$  macroscópico de la especie ( $pK^i$ ). b) Correlación entre  $\log k_1^i$  y la diferencia  $pK_N - pK^i$ , donde  $pK_N$  es el  $pK$  del ión  $n$ -hexilamonio. Los datos corresponden al sistema  $n$ -hexilamina + PLP en mezclas agua dioxano. Junto a la figura se indica la fracción en volumen de dioxano.

que incluye todos los valores de  $\log k_1^i$  obtenidos en este trabajo en diferentes mezclas agua-dioxano. Se observa una correlación lineal aceptable, lo que sugiere que el efecto del disolvente y el efecto de la catálisis ácida intramolecular pueden interpretarse conjuntamente; de acuerdo con esta correlación, la variación de los valores de  $k_1^i$  con la fracción de dioxano se debería, en realidad, al efecto del disolvente sobre los valores de pK del PLP (o sea, sobre la capacidad catalítica del PLP). Desgraciadamente, esta correlación no parece cumplirse para sistemas similares estudiados recientemente por otros autores, tal como se observa en las figuras 99.a [n-hexilamina + PLP en mezclas agua-etanol, García del Vado et al. (1988)] y 100.a [n-hexilamina + deoxipiridoxal en mezclas agua-dioxano, Vázquez (1988)]; nótese en estas figuras que, aun cuando existe una buena correlación entre  $\log k_1^i$  y los valores de pK para cada mezcla disolvente concreta, la correlación global (incluyendo todas las mezclas) no es buena.

Este resultado nos ha llevado a analizar, desde el punto de vista del mecanismo de la reacción, el origen de la correlación  $\log k_1^i/pK$  para la formación de bases de Schiff de PLP y sustancias relacionadas. Se admite generalmente que la formación de bases de Schiff consta de dos etapas (Jencks, 1969):

a) ataque de la amina no protonada sobre el grupo carbonilo para dar lugar a una carbinolamina intermedia:



b) deshidratación de la carbinolamina para dar lugar a la

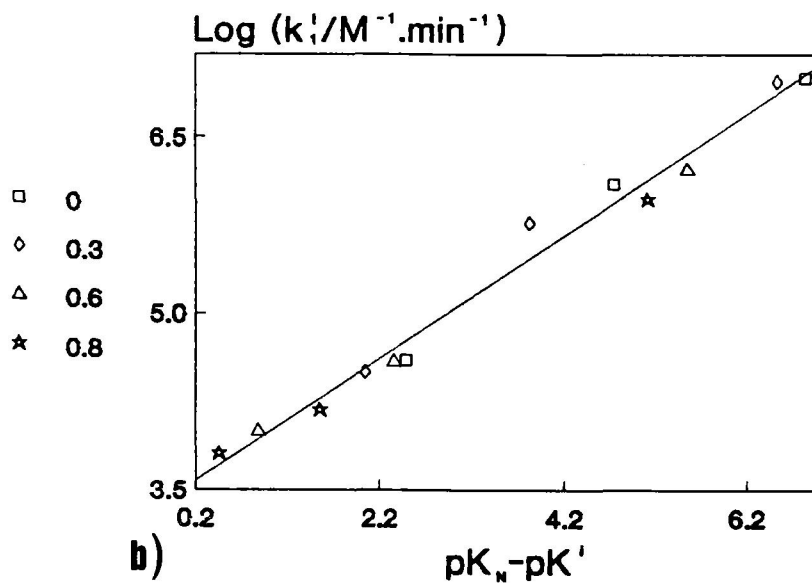
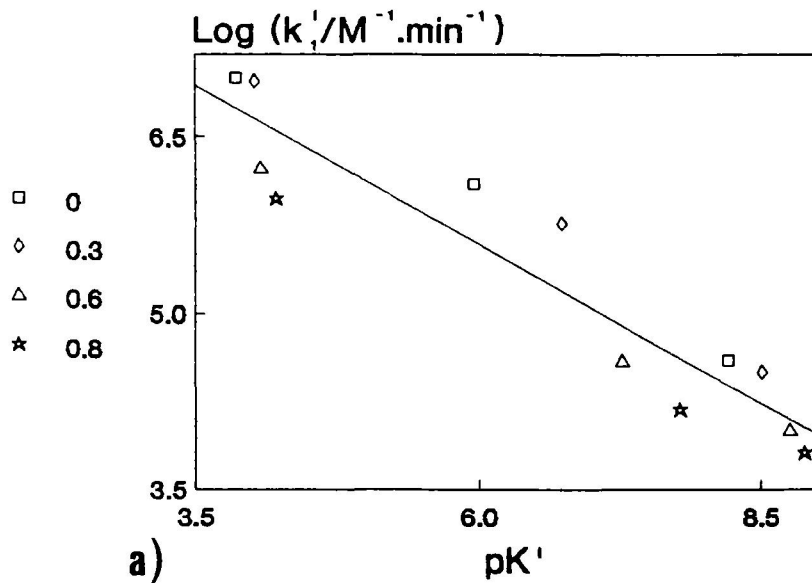


FIGURA 99. a) Correlación entre el logaritmo de la constante cinética de formación de la base de Schiff a partir de una especie del PLP con  $i$  protones lábiles ( $k_1^i$ ) y el  $\text{pK}$  macroscópico de la especie ( $\text{pK}^i$ ). b) Correlación entre  $\text{log } k_1^i$  y la diferencia  $\text{pK}_N - \text{pK}^i$ , donde  $\text{pK}_N$  es el  $\text{pK}$  del ión  $n$ -hexilamonio. Los datos corresponden al sistema  $n$ -hexilamina + PLP en mezclas agua-etanol (García del Vado et. al., 1988). Junto a la figura se indica la fracción en volumen de etanol.

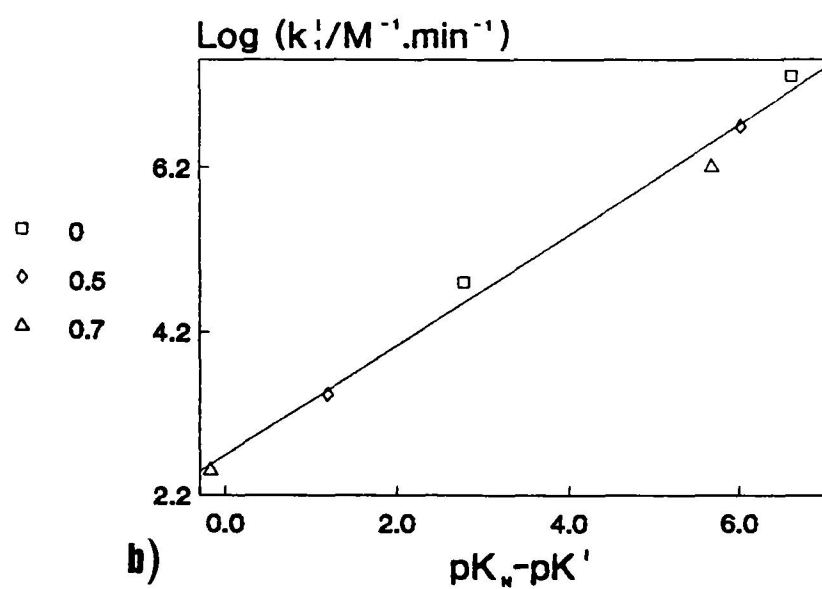
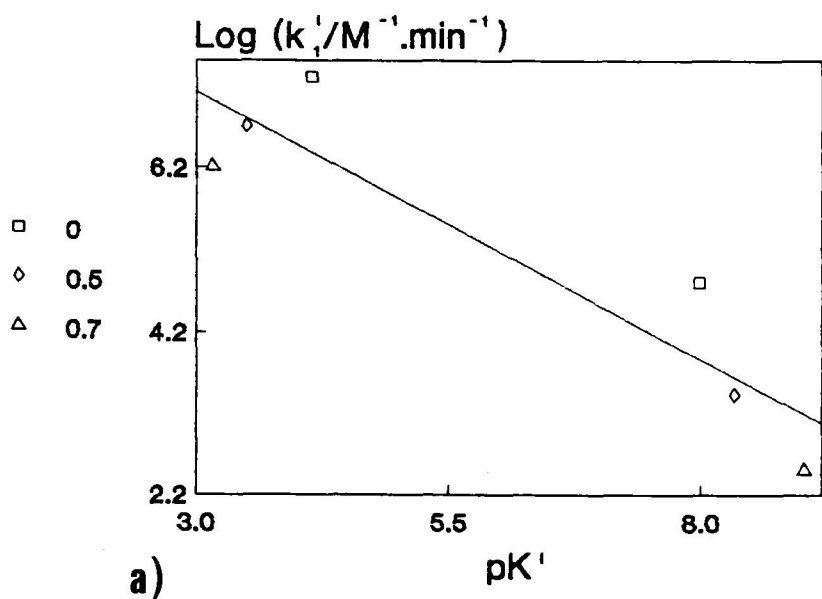
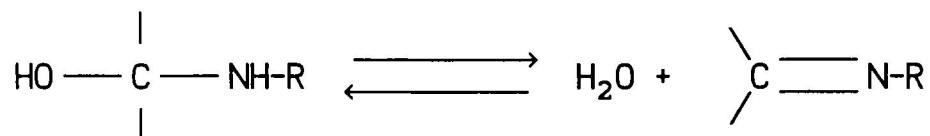
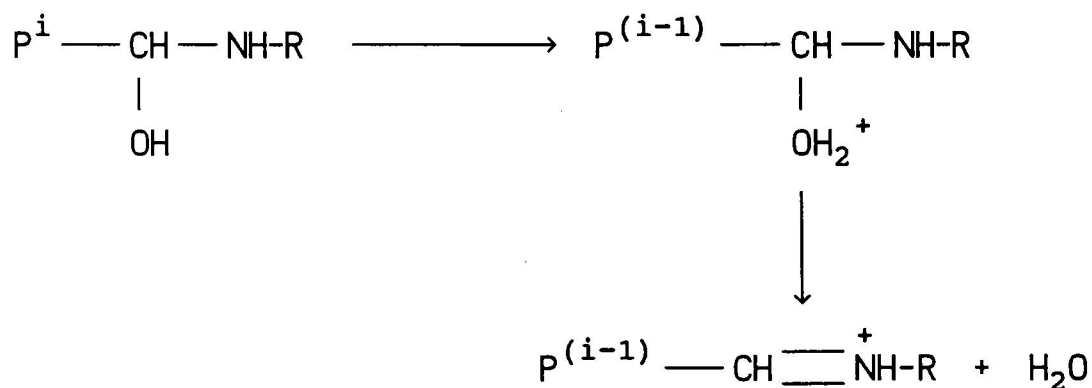


FIGURA 100. a) Correlación entre el logaritmo de la constante cinética de formación de la base de Schiff a partir de una especie del PLP con  $i$  protones lábiles ( $k_1^i$ ) y el  $pK$  macroscópico de la especie ( $pK^i$ ). b) Correlación entre  $\log k_1^i$  y la diferencia  $pK_N - pK^i$ , donde  $pK_N$  es el  $pK$  del ión  $n$ -hexilamonio. Los datos corresponden al sistema  $n$ -hexilamina + 5-deoxipiridoxal en mezclas agua-dioxano (Vázquez, 1988). Junto a la figura se indica la fracción en volumen de dioxano.

base de Schiff:

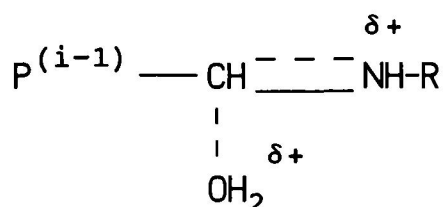


En la mayoría de los casos, la carbinolamina intermedia se encuentra en concentración muy baja, siendo la etapa determinante su formación o su deshidratación dependiendo del pH y de la naturaleza del aldehído y la amina (Jencks, 1969). En la formación de bases de Schiff del PLP y sustancias relacionadas, la evidencia existente en la bibliografía (Hershey y Leussing, 1977; Sánchez-Ruiz et al., 1982; Llor et al., 1989) indica que la etapa determinante es la deshidratación, al menos en el intervalo de pH usualmente estudiado (pH > 3, aproximadamente). Por lo tanto, la catálisis ácida intramolecular propuesta para estas sustancias debe interpretarse como una transferencia de un protón desde el anillo de PLP al centro de reacción, facilitando dicha transferencia la expulsión (como molécula de agua) del grupo OH de la carbinolamina intermedia. Muy esquemáticamente, este proceso podría representarse de la siguiente manera:



donde P representa el anillo de PLP, indicando el superíndice el

número de protones lábiles presentes. Este esquema implica un ión oxonio (carga positiva en el oxígeno), siendo el producto final la base Schiff con carga positiva en el nitrógeno. Parece, por tanto, razonable proponer la siguiente estructura para el estado de transición:



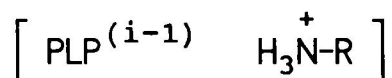
en la que ambos el oxígeno y el nitrógeno poseen carga parcial. A partir de ahora supondremos (sin evidencia) que el doble enlace se encuentra prácticamente formado en el estado de transición y que, por tanto, el nitrógeno de la base de Schiff posee la mayor parte de la carga positiva.

El cambio de energía de Gibbs de activación para la reacción (diferencia entre las energías de Gibbs del estado de transición y los reactivos) puede en principio descomponerse en dos términos:

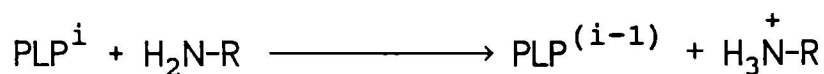
$$\Delta G^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger + \Delta G_S^\ddagger \quad (171)$$

donde  $\Delta G_0^\ddagger$  es un término constante y  $\Delta G_S^\ddagger$  es un término que depende del disolvente. Obviamente,  $\Delta G_S^\ddagger$  está relacionado con las interacciones de los reactivos y el estado de transición con el disolvente (concretamente, con la diferencia entre las energías de Gibbs correspondientes a dichas interacciones). Dado que hemos supuesto que en el estado de transición existe una carga positiva sobre el nitrógeno de la base de Schiff y que el anillo de PLP posee un protón lábil menos, parece razonable suponer, además, que

la interacción del estado de transición con el disolvente es similar a la de una molécula de n-hexilamina protonada más la de una molécula de PLP con i-1 protones lábiles. O sea, desde el punto de vista de la interacción con el disolvente, el estado de transición equivale a:



y, por tanto,  $\Delta G_s^\ddagger$  vendrá dado por el cambio de energía de Gibbs del siguiente proceso de transferencia protónica:



el cual es igual a  $RT \times (\ln 10) \times (pK^i - pK_N)$ , donde  $pK_N$  es el pK del ion n-hexilamonio y  $pK^i$  el de la especie del PLP con i protones lábiles. Por tanto, teniendo en cuenta la relación existente entre una constante cinética y el cambio de energía de Gibbs de activación (teoría de las velocidades absolutas):

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad \begin{array}{l} k_B : \text{constante de Boltzmann} \\ h : \text{constante de Planck} \end{array}$$

y que  $\Delta G_0^\ddagger$  se ha supuesto constante, se llega fácilmente a:

$$\log k_1^i = \log k_0 + (pK_N - pK^i) \quad (172)$$

por lo que una representación de  $\log k_1^i$  frente a la diferencia entre los valores de pK del ion hexilamonio y el PLP debe ser una

línea recta de pendiente unidad (nótese que el pK del ion hexilamonio depende de la composición del disolvente; ver figura 101). En las figuras 98.b, 99.b y 100.b se dan dichas representaciones para los tres sistemas que estamos considerando:

n-hexilamina + PLP en agua-dioxano (este trabajo).

n-hexilamina + PLP en agua-etanol (García del Vado et al., 1988).

n-hexilamina + deoxipiridoxal en agua-dioxano (Vázquez, 1988).

En los tres casos se obtienen excelentes correlaciones lineales, las cuales describen conjuntamente (para un sistema dado) el efecto del número de protones lábiles (catálisis ácida intramolecular) y el efecto del disolvente sobre las constantes cinéticas.

Hay que reconocer (ver figura 102), sin embargo, que: a) las pendientes de las representaciones son significativamente menores que la unidad; b) no es posible describir conjuntamente los tres sistemas con la misma correlación (cada sistema da lugar a una línea de correlación diferente en la figura 102). Creemos que es posible proponer una interpretación plausible (aunque especulativa) para esta situación en base a la interacción electrostática entre las cargas negativas del anillo de PLP y la carga positiva que se desarrolla en el estado de transición. Así, las tres líneas rectas de la figura 102 convergen para valores altos de  $(pK_N - pK^1)$  (o sea, los valores de  $\log k_1^1$  correspondientes a las especies con el mayor número de protones lábiles son muy similares), observándose las diferencias mayores para los valores más bajos de  $(pK_N - pK^1)$ , es decir para las especies con un sólo



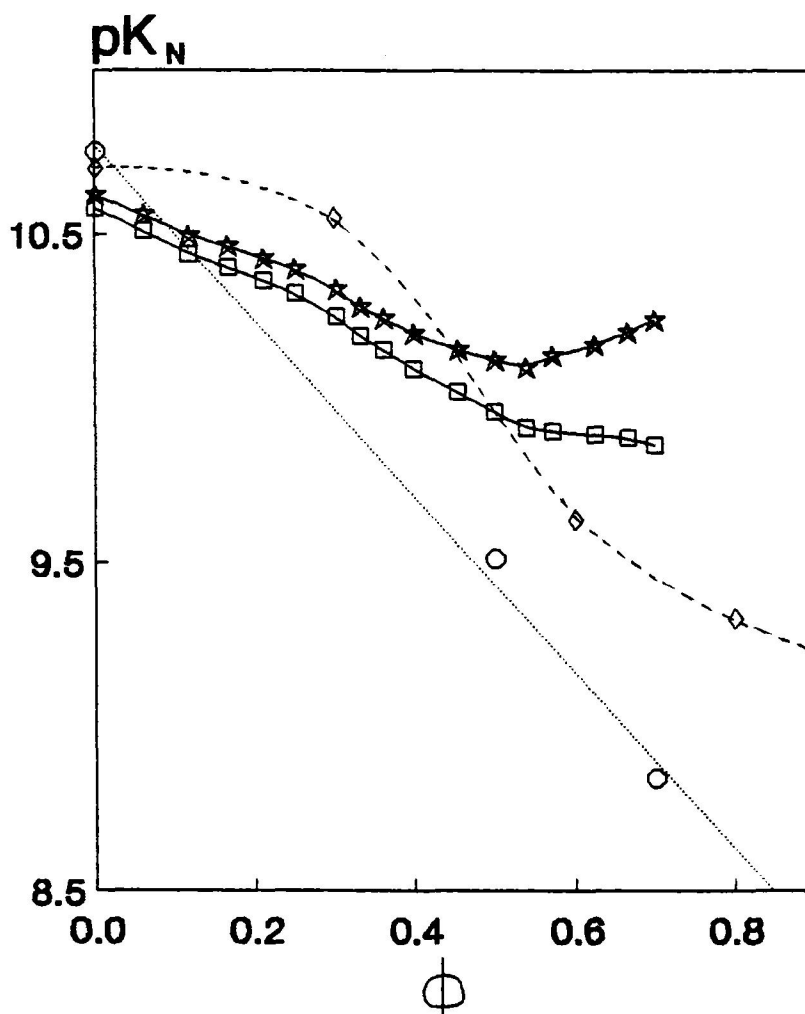


FIGURA 101. Efecto de la fracción de codisolvente orgánico sobre el pK del ión n-hexilamonio. (□) mezclas agua-dioxano a fuerza iónica 0 (Llor et al., 1989), (☆) mezclas agua-dioxano a fuerza iónica 0.01 (Llor et al., 1989); (○) mezclas agua-dioxano a fuerza iónica 0.1 (Vázquez, 1988); (◇) mezcla agua-etanol a fuerza iónica 0.1 (García del Vado et al., 1988).

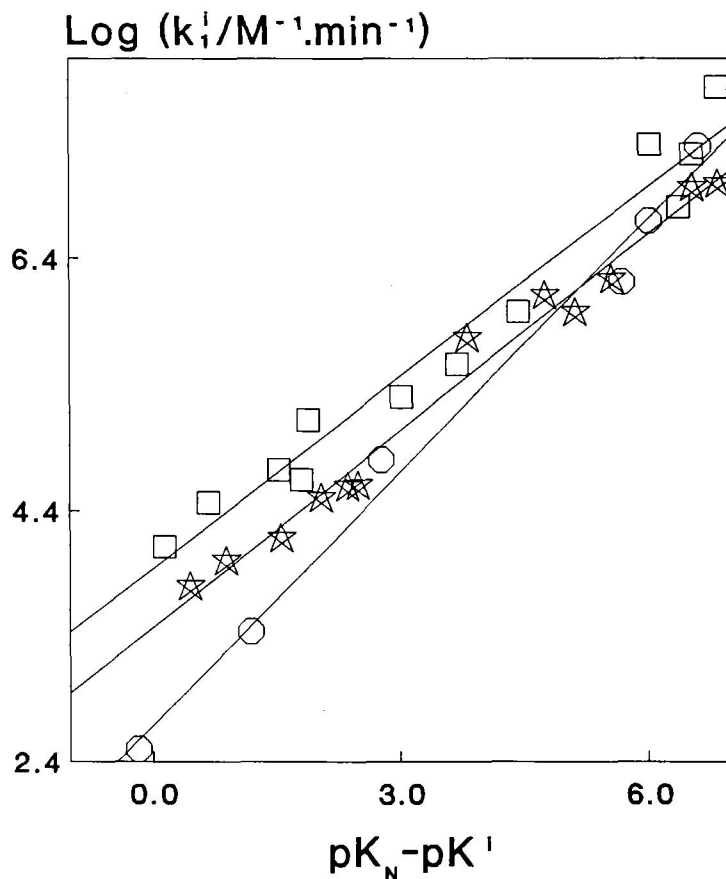


FIGURA 102. Correlación entre el logaritmo de la constante cinética de formación de base de Schiff a partir de una especie iónica del PLP (o deoxipiridoxal) con la diferencia ( $pK_N - pK^1$ ), donde  $pK_N$  es el pK del ión n-hexilamonio y  $pK^1$  el pK macroscópico de dicha especie.

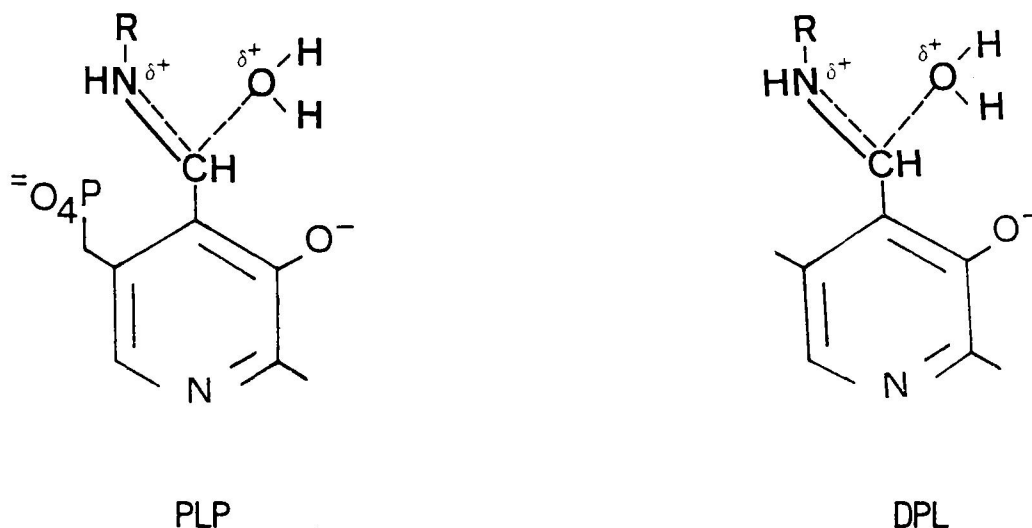
(□) sistema n-hexilamina + PLP en agua-dioxano (este trabajo).

(☆) sistema n-hexilamina + PLP en agua-etanol (García del Vado et al., 1988).

(○) sistema n-hexilamina + deoxipiridoxal en agua-dioxano (Vázquez, 1988).

protón lábil.

En la figura 103 se comparan los valores de la constante cinética de formación de base de Schiff con n-hexilamina de las especies con un protón lábil del PLP (este trabajo) y el deoxipiridoxal (Vázquez, 1988), en mezclas agua-dioxano en ambos casos (nótese que, aun cuando los valores de  $(pK_N - pK^1)$  son similares, las constantes cinéticas son muy diferentes). En este caso, el único protón lábil se transfiere al centro de reacción (catálisis ácida intramolecular), por lo que los respectivos estados de transición pueden representarse como:



donde seguimos suponiendo que la mayor parte de la carga positiva se encuentra sobre el nitrógeno imínico. Obviamente, la única diferencia significativa es la presencia en el PLP de dos cargas negativas adicionales sobre el grupo fosfato. Parece lógico suponer que la interacción electrostática entre estas dos cargas negativas y la carga positiva existente en el centro de reacción contribuya a estabilizar el estado de transición, disminuir la

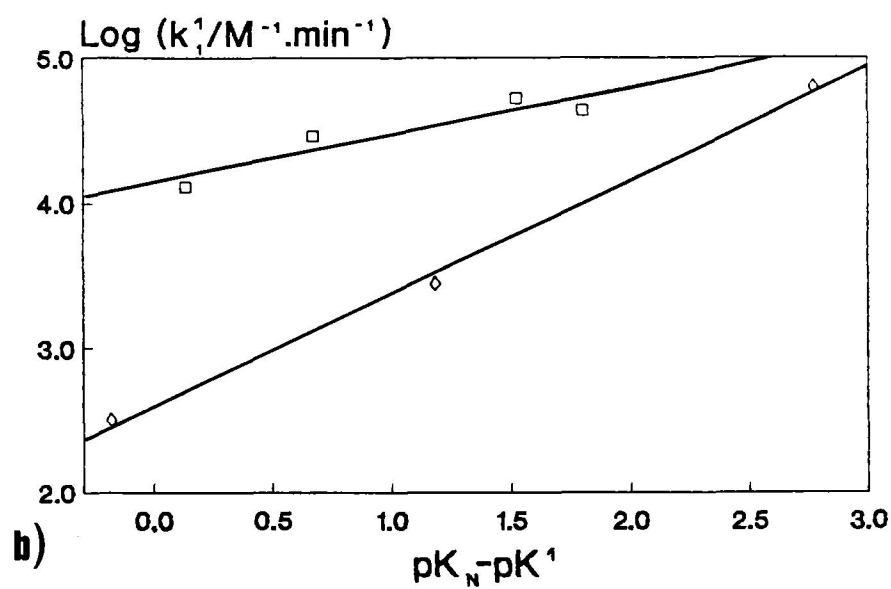
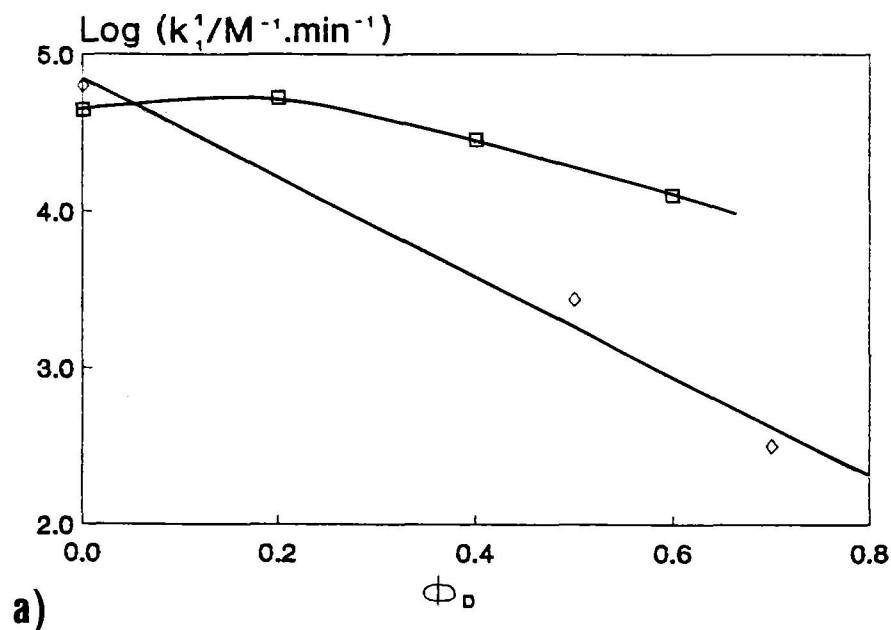


FIGURA 103. a) Efecto de la fracción de dioxano sobre la constante cinética de formación de base de Schiff a partir de las especies con un protón lábil del PLP (□, este trabajo) y el deoxipiridoxal (◇, Vázquez, 1988). b) Representación de los logaritmos de estas constantes frente a la diferencia ( $pK_N - pK^1$ ), donde  $pK_N$  es el  $pK$  del ión n-hexilamonio y  $pK^1$  es el  $pK$  de la especie del PLP (o deoxipiridoxal) con un protón lábil,

energía de Gibbs de activación y aumentar, por tanto el valor de la constante cinética de formación; cabe esperar, además, que esta interacción sea más importante en los medios de baja constante dieléctrica; nótese que éste es precisamente el efecto observado en la figura 103: así, los valores de  $k_1^1$  son similares en agua, mientras que, en las mezclas con alto contenido en dioxano, el valor de  $k_1^1$  para el PLP es más de un orden de magnitud superior al correspondiente al deoxipiridoxal. Por último, el hecho de que las constantes dieléctricas de las mezclas agua-etanol sean superiores a las de las mezclas agua-dioxano explicaría la mayor pendiente de la correlación correspondiente al sistema n-hexilamina + PLP en agua-etanol dado que el efecto estabilizador de las cargas negativas sería menor en estas mezclas (la pendiente de la recta  $\log k_1^1$  versus  $(pK_N - pK^1)$  es 0.521 para n-hexilamina + PLP en agua-etanol y 0.505 en agua-dioxano, mientras que vale 0.671 para n-hexilamina + deoxipiridoxal en agua-dioxano, ver figura 102).

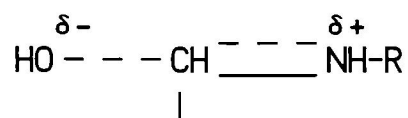
En resumen, de acuerdo con el esquema que hemos propuesto, dos factores determinan la cinética de formación de la base de Schiff del PLP (al menos en lo que se refiere a las especies con uno o más protones lábiles):

a) la catálisis ácida intramolecular; es decir la transferencia de un protón desde el anillo al centro de reacción, con la consiguiente aparición de una carga positiva en dicho centro en el estado de transición.

b) la estabilización de la carga positiva del centro de reacción debido a la interacción con las cargas negativas presentes en el anillo.

Esta interpretación debe considerarse, por supuesto, como

provisional, dado que está basada en el análisis de un número limitado de datos. En cualquier caso, no es aplicable a la constante cinética  $k_1^0$  que corresponde a la especie iónica del PLP que no posee protones lábiles; la deshidratación de la carbinolamina intermedia implica, en este caso, la expulsión no catalizada (o catalizada por el disolvente) de ión  $\text{OH}^-$ , por lo que el estado de transición presentará separación de cargas en el centro de reacción. Esquemáticamente:



Esta separación de cargas estará favorecida en disolventes polares, por lo que cabe esperar que  $k_1^0$  disminuya al aumentar el contenido en dioxano del disolvente, tal como de hecho se observa experimentalmente (ver figura 96).

\*                      \*                      \*

El efecto de la fracción de dioxano en el disolvente sobre las constantes cinéticas individuales de hidrólisis de la base de Schiff del PLP con n-hexilamina se muestra en la figura 104. Hay que notar que las constantes de hidrólisis  $k_2^1$  inicialmente obtenidas son de pseudo primer orden e incluyen la concentración de agua; las correspondientes constantes de segundo orden (calculadas como  $k_2^1/[\text{H}_2\text{O}]$ ) se dan también en la figura 104.

No se observa, en este caso, ninguna dependencia significativa de los valores de  $\log k_2^1$  con los pK de la base de Schiff; por otra parte, tampoco parece haber una tendencia común a

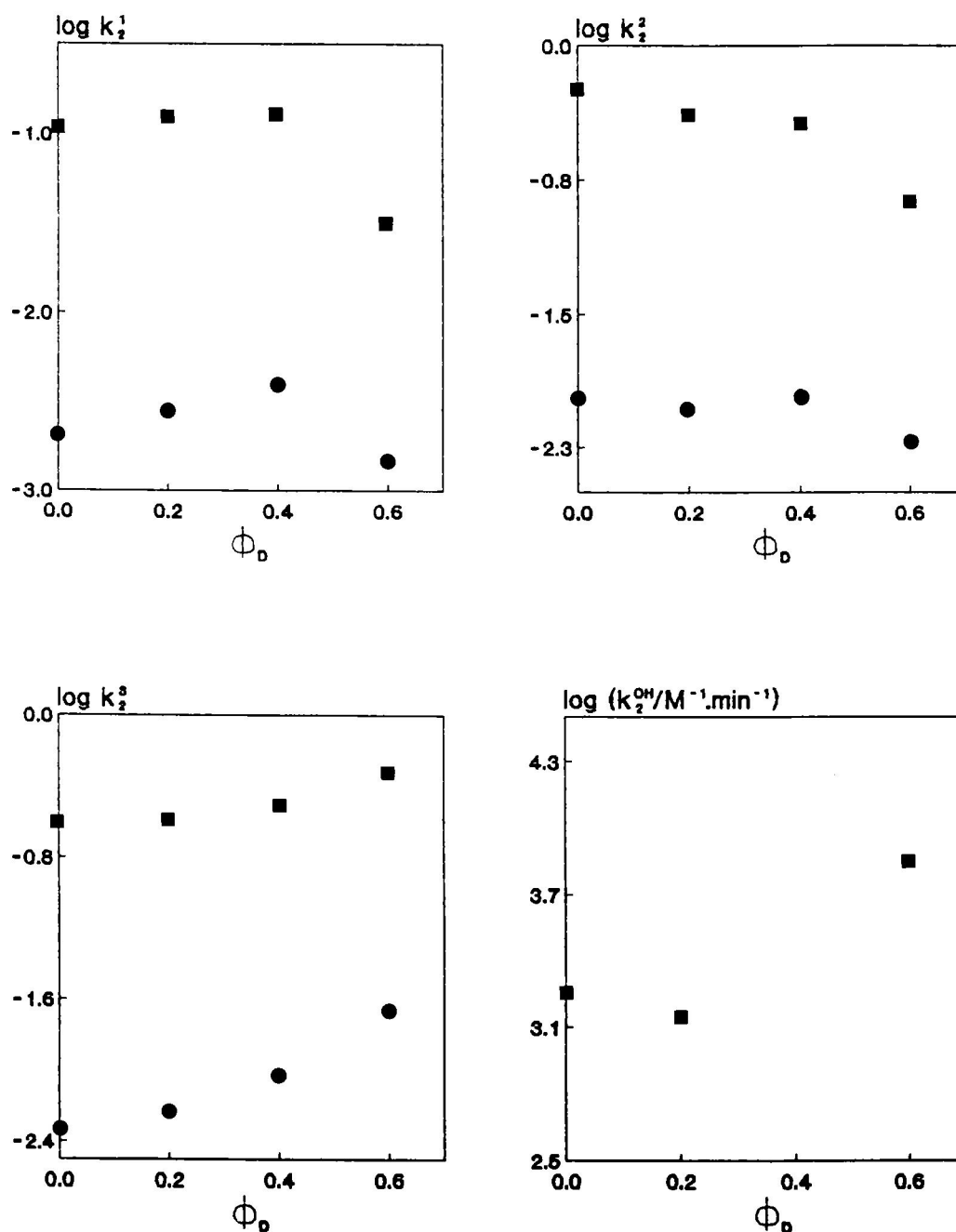


FIGURA 104. Efecto del disolvente sobre las constantes cinéticas individuales correspondientes a la hidrólisis de la base de Schiff formada entre el PLP y la n-hexilamina.  $\phi_D$  representa la fracción en volumen de dioxano. (■) constantes de pseudo primer orden que incluyen la concentración de agua (en  $\text{min}^{-1}$ ). (●) constantes de segundo orden calculadas como  $k_2^1 / [\text{H}_2\text{O}]$  (en  $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

las tres constantes ( $k_2^1$ ,  $k_2^2$  y  $k_2^3$ ) en lo que se refiere al efecto de la fracción de dioxano. Las formas moleculares de las bases de Schiff del PLP que se encuentran en proporción significativa en disolución acuosa se dan en el esquema 11. Las formas mayoritarias en agua corresponden a tautómeros cetoenammina que presentan un marcado carácter dipolar (ver esquema 12).

Las proporciones de las distintas formas se verán fuertemente afectadas por la polaridad del disolvente (Llor y Cortijo, 1977), estando favorecidos los tautómeros tipo enolimina en las mezclas con alto contenido en dioxano. Cabe esperar que los tautómeros cetoenammina sean más susceptibles al ataque del agua que los tipo enolimina, ya que, en los primeros, existe una carga positiva parcial sobre el nitrógeno imínico. Esto conllevaría una disminución de los valores de  $k_2^1$  al aumentar la fracción de dioxano, efecto que no parece observarse en la figura 104.

Una posibilidad adicional a tener en cuenta es que, en algunas especies, los tautómeros cetoenammina como los enolimina, sean relativamente poco susceptibles al ataque del agua, ocurriendo entonces la hidrólisis a partir de otras formas moleculares presentes en baja proporción (ver esquema 11). En cualquier caso no disponemos de información sobre las proporciones de los distintos tautómeros de la base de Schiff del PLP en mezclas agua-dioxano, ni sobre la susceptibilidad relativa de estos al ataque del agua. Por tanto, no parece posible, en este momento, proponer interpretaciones plausibles para el efecto de la fracción de dioxano sobre las constantes de hidrólisis individuales dadas en la figura 104.



## 8. CONCLUSIONES



1) Se ha puesto a punto un método potenciométrico para la determinación de las constantes de ionización y las constantes de equilibrio de formación de bases de Schiff. Este método se basa en la titulación, con una base fuerte, del sistema [aldehído + amina  $\rightleftharpoons$  base de Schiff] en equilibrio.

2) Se ha puesto a punto un método para la obtención de las constantes cinéticas de formación e hidrólisis de bases de Schiff que no requiere el empleo de tampones y que permite, por tanto, trabajar a baja fuerza iónica. Este método resulta conveniente en estudios en mezclas agua-codisolvente orgánico.

3) Se ha demostrado que es posible también obtener información sobre la cinética de formación e hidrólisis de bases de Schiff a partir de los cambios de pH con el tiempo observados en las titulaciones potenciométricas del sistema [aldehído + amina  $\rightleftharpoons$  base de Schiff].

4) La metodología desarrollada se ha aplicado al estudio del sistema [n-hexilamina + 5'-fosfato de piridoxal  $\rightleftharpoons$  base de Schiff] en mezclas agua-dioxano. Se ha encontrado que, en este caso, la constante cinética de formación de base de Schiff aumenta considerablemente con el número de protones lábiles presentes inicialmente en la molécula de fosfato de piridoxal, lo cual sugiere fuertemente que la reacción está sujeta a catálisis ácida

intramolecular, tanto en agua como en las mezclas más ricas en dioxano.

5) La comparación de los datos cinéticos obtenidos con los publicados recientemente sobre sistemas similares sugiere que dos factores juegan un papel fundamental en la cinética de formación de bases de Schiff del fosfato de piridoxal: a) la transferencia de un protón desde el anillo de fosfato de piridoxal al centro de reacción (catálisis ácida intramolecular); b) la estabilización de la carga positiva desarrollada en el estado de transición debido a la interacción con las cargas negativas presentes en el anillo.

## BIBLIOGRAFIA



- . Ahrens, M. L., Maass, G., Schuster, P. y Winkler, M. J. *Am. Chem. Soc.*, 92, 6134 (1970).
- . Anderson, F. J. y Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 715 (1964).
- . Arnone, A., Christen, P., Jansonius, J. N. y Metzler, D. E.. "*Transaminases*". Christen, P. y Metzler, D. E., eds. John Wiley and Sons, New York p. 326 (1985).
- . Arrio-Dupont, M. *Photochem. Photobiol.*, 12, 197 (1970).
- . Asensio, S., Cortijo, M., López-Cantarero, E., Llor, J., Plaza, I. y Sánchez-Ruiz, J. M. "*Biochemistry of Vitamin B<sub>6</sub>*". Korpela, T. y Christen, P., eds. Birkhäuser, Basel, p. 359 (1987).
- . Auld, D. S. y Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2083 (1967).
- . Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, D. H. y Cori, C. F. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 16 (1957).
- . Bates, R. G. "*Determination of pH. Theory and Practice*". J. Wiley and Sons. 2 Ed. (1973).

. Bazhulina, N. P., Lomakin, A. Ya., Morozov, Yu. V., Savin, F. A., Cherkashina, L. P., Karpeisky M. Ya. y Florentiev, V. L'. *Molekulyarnaya Biologiya* 4, 889 (1970).

. Bazhulina, N. P., Lomakin, A. Ya., Morozov, Yu. V., Savin, F. A., Karpeisky, M. Ya., Florentiev, V. L. y Cherkashina, L. P. *Biofizika* 19, 269 (1974).

. Blázquez, M., Sevilla, J. M., Pérez, J., Dominguez, M. y Garcia-Blanco, F., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1229 (1989).

. Blázquez, M., Sevilla, J. M., Pérez, J., Dominguez, M. y Garcia-Blanco, F., "Biochemistry of Vitamin B<sub>6</sub>". Korpela, T. y Christen, P., eds. Birkhäuser, Basel, pg 353 (1987).

. Bevington, P. R. "Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences", Ed. Mc Graw-Hill (1969).

. Christensen, J. J., Hansen, L. D. y Izatt, R. H. "Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities", Wiley Interscience, N. Y. (1976).

. Cortijo, M., Llor, J., Jimenez, J. S. y Garcia-Blanco, F. *Eur. J. Biochem.*, 65, 521 (1976).

. Cortijo, M., Llor, J. y Sánchez-Ruiz, J. M. *J. Biol. Chem.*,



263, 17960 (1988).

. Cortijo, M. y Sánchez-Ruiz, J. M. *An. Quim.* 80, 471 (1984).

. Cortijo, M. y Shaltiel, S. *European J. Biochem.*, 29, 134 (1972).

. Cortijo, M. y Shaltiel, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 212 (1970).

. Cortijo, M., Steinberg, I. Z. y Shaltiel, S. *J. Biol. Chem.*, 246, 933 (1971).

. French, T. C., Auld, D. S. y Bruice, T. C. *Biochemistry*, 4, 77 (1965).

. French, T. C. y Bruice, T. C. *Biochemistry*, 3, 1589 (1964).

. Froser, R. D. y Suzuki, E. "Physical Principles and Techiques of Protein Chemistry" Leach, S. J., ed. Academic Press, New York. Parte C, p. 301 (1973).

. García del Vado, M. A., Donoso, J., Muñoz, F., Echevarria, G. y García Blanco, F. *J. Chem. Soc. Perkins. II*, 445 (1987).

. García del Vado, M. A., Echevarria, G. R., García-Espantaleón, A., Donoso, J., Muñoz, F. y García Blanco, F.

*J. of Molecular Catalysis* 44, 313 (1988).

. Haran, R., Nephen-Huras, F. y Laurent, J. P. *Org. Magn. Reson.*, 10, 203 (1977).

. Harned, H. S. y Owen, B. B. "*The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions*". Reinhold, N. York, 3 Ed. (1958).

. Harris, C. M., Johnson, R. J. y Metzler, D. E. *Biochim. Biophys. Acta*, 421, 181 (1976).

. Harruff, R. C. y Jenkins, W. T. *Org. Magn. Reson.*, 8, 548 (1976).

. Heinert, D. y Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3257 (1962).

. Heinert, D. y Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 188 (1963).

. Herscovitch, R., Charette, J. J. y de Hoffmann, E. *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 5135 (1973).

. Herscovitch, R., Charette, J. J. y de Hoffmann, E. *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 4954 (1974)

. Helmreich, E. J. M. y Klein, H. M. *Angew Chem. Int. Ed.*

Engl., 19, 441 (1980).

. Hershey, S. A. y Leussing, D. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 1992 (1977).

. Holley, J., Bender, D. A., Coulson, W. F. y Lymes, E. "Chemical and Biological Aspects of vitamin B<sub>6</sub> Catalysis". Part. A4. A. E. Evangelopoulos (Ed). Alan R. Liss, N. York. pp. 55 (1984).

. Jencks, W. P. "Catalysis in Chemistry and Enzymology", Mc Graw Hill, New York, 1969.

. Jo, V. H., Nair, V. y Davis, L. *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 4467 (1977).

. Johnson, R. J. y Metzler, D. E. *Methods Enzymol.*, 18A, 433 (1970).

. Johnson, L. N., Oikonomatos, N. G., Acharya, K. R., Stuart, D. I., Barford, D., Haydn, J. y Varvill K. M.. "Biochemistry of Vitamin B<sub>6</sub>". Korpela, T. y Christen, P., Eds. Birkhauser, Basel, p. 255 (1987).

. Kallen, R. G., Korpela, T., Martell, A. E., Matsushima, Y., Metzler, C. M., Metzler, D. E., Morozov, Y. V., Ralston, I. M.,

Savin, F. A., Torchinsky, Y. y Ueno, H. "Transaminases". Christen, P. y Metzler, D. E., eds. John Wiley and Sons, New York, p. 37 (1985).

. Korytnyk, W., y Singh, R. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2813 (1963).

. Kosower, E. M. "An introduction to Physical Organic Chemistry". J. Wiley and Sons (1968).

. Llor, J., Asensio, S. y Sánchez-Ruiz, J. M. *International J. of Chem. Kinetics*, 21, 51 (1989a).

. Llor, J. y Cortijo, M. J. *Chem. Soc. Perkin II*, 1111 (1977).

. Llor, J. y Cortijo, M. J. *Chem. Soc. Perkin II*, 409 (1978).

. Llor, J., Sánchez-Ruiz, J. M. y Cortijo, M. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 951 (1988).

. Llor, J., Sánchez-Ruiz, J. M., Plaza del Pino, I. y Cortijo, M. *An. Quim.* 85, 162 (1989b).

. Llor, J., Sánchez-Ruiz, J. M., Rodríguez-Pulido, J. M. y Cortijo, M., *An. de Química* 80, 27 (1984).

- . Llor, J., Sánchez-Ruiz, J. M., del Sol, V. M. y Plaza I. M. *An. Quim.* 85, 350 (1989c).
- . Lowry, T. H. y Richardson, K. S. "*Mechanism and Theory in Organic Chemistry*". Ed. Harper and Row, New York, 1976.
- . Madsen, N. B. y Withers, W. G. "*Coenzymes and cofactors; Pyridoxal Phosphate and Derivatives*". Dolphin, D., Paulson, R. y Auramovic, O., Eds. John Wiley and Sons, New York, p. 1 (1986).
- . Marshall, W. L., *J. Phys. Chem.* 74, 346 (1970).
- . Martell, A. E. "*Advances in Enzymology and Related areas of Molecular Biology*" 53, 163 (1982)
- . Matsushima, Y. y Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 1322 (1967).
- . Metzler, D. E. "*Bioquímica. Las reacciones químicas en las células vivas*". Omega, Barcelona. p. 458 (1981)
- . Metzler, C. M., Cahill, A. y Metzler, D. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 6075 (1980).
- . Metzler, D. E., Harris, C. M., Johnson, R. J., Siano, D. B. y Thomson, J. A., *Biochemistry*, 12, 5377 (1973).

. Metzler, D. E., Harris, C. M., Reeves, R. L., Lawton, W. H. y Maggio, M. S. *Anal. Chem.*, 49, 864A (1977).

. Metzler, D. E., Longenecker, J. B. y Snell, E. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2786 (1953).

. Metzler, D. E., Longenecker, J. B., y Snell, E. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 630 (1954b).

. Metzler, D. E., Olivard, J., y Snell, E. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 644 (1954a).

. Metzler, D. E., y Snell, E. E. *J. Biol. Chem.* 198, 363 (1952).

. Metzler, D. E. y Snell, E. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2431 (1954).

. Motekaitis, R. J. y Martell, A. E. *Can. J. Chem.*, 60, 2403 (1982).

. Olivard, J., Metzler, D. E. y Snell, E. E. *J. Biol. Chem.*, 169, 643 (1952).

. Nagano, K. y Metzler, D. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 2891 (1967).

- . Palmer, J. L. y Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 6466 (1980).
- . Peterson, E. A. y Sober, H. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 169 (1954).
- . Quist, A. S. y Marshall, W. L. *J. Phys. Chem.* 72, 1536 (1968a).
- . Quist, A. S. y Marshall, W. L. *J. Phys. Chem.* 72, 1545 (1968b).
- . Sánchez-Ruiz, J. M., Asensio, S., Llor, J. y Cortijo, M. *J. Chem. Soc. Perkins Trans II*, 169 (1987).
- . Sánchez-Ruiz, J. M., Llor, J., y Cortijo, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 2047 (1984a).
- . Sánchez-Ruiz, J. M., Llor, J. y Cortijo, M. *An. Quim.* 81, 17 (1985).
- . Sánchez-Ruiz, J. M., Llor, J. y Cortijo, M. *An. Quim.* 81, 17 (1986).
- . Sánchez-Ruiz, J. M., Llor, J., López-Cantarero, E. y Cortijo, M. "Chemical and Biological Aspects of Vitamin B<sub>6</sub> Catalysis". A. E. Evangelopoulos (Ed.), Alan R. Liss, N. York, p.

79 (1984b).

. Sánchez-Ruiz, J. M., Llor, J., López-Cantarero, E. y Cortijo, M. *An. Quim.* 80, 708 (1984c).

. Sánchez-Ruiz, J. M., Rodríguez-Pulido, J. M., Llor, J. y Cortijo, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1425 (1982).

. Seliskar, C. J., *J. Mol. Spectrosc.* 53, 140 (1974).

. Seliskar, C.. *J. J. Phys. Chem.* 81, 1331 (1977).

. Shaltiel, S., y Cortijo, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 594 (1970).

. Shaltiel, S., Cortijo, M., y Zaidenzaig, Y. "Probing and Mapping the PLP site of Glycogen Phosphorylase" en "Metabolic Interconversion of Enzymes", Wieland, O, Helmreich, E. y Holzer, H., eds. Springer-Verlag (1972)

. Shaltiel, S., Hedrick, I. y Fischer, E. H. *Biochemistry*, 5, 2108 (1966).

. Siano, D. B. y Metzler, D. E. *J. Chem. Phys.*, 51, 1856, (1969).

. Sigman, D. S. y Mooser, G. *Ann. Rev. Biochemistry*, 44, 904



(1975).

. Snell, E. E. *J. Biol. Chem.*, 154, 313 (1944)

. Snell, E. E. *J. Biol. Chem.*, 67, 194 (1945).

. Snell, E. E. "Transaminases". Christen, P. y Metzler, D. E., Eds. John Wiley and Sons, New York, p. 19 (1985).

. Snell, E. E., Braunstein, A. E., Severin, C. S. y Torchinsky, Yu. M. (Eds). "Pyridoxal Catalysis: Enzymes and Model Systems", Wiley, New York, 1968.

. Snell, E. E., Fasella, P. M., Braunstein, A. E. y Rossi-Fanelli, A. (Eds). "Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis" Pergamon, New York, 1963.

. Snell, E. E. y Haskell, B. E. *Compr. Biochem.*, 21, 47 (1971).

. Strausbauch, P. H. y Fischer, E. H. *Biochemistry*, 9, 233 (1970).

. Tobias, P. S. y Kallen, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6530 (1975).

. Van Uitert, L. G. y Fernelius, W. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 76,

5887 (1954).

. Van Uitert, L. G. y Haas, C. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 451 (1953).

. Vázquez, M. A., Donoso, J., Muñoz, F., García-Blanco, F., García del Vado, M. A. y Echevarría, G. *Bulletin de la Société Chimique de France* 2, 361 (1988).

. Vázquez, M. A., Echevarría, G., Muñoz, F., Donoso, J. y Garcia Blanco, F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1617 (1989).

. Weng, S. H. y Leussing, D. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 4082 (1983).

. Witherup, T. H., y Abbot, E. H. *J. Org. Chem.*, 40, 2229 (1975).

## APENDICE I



COEFICIENTES DE ACTIVIDAD IONICOS MEDIOS DEL HCL EN MEZCLAS  
AGUA-DIOXANO.

En esta Memoria se utilizan los coeficientes de actividad iónicos medios del ácido clorhídrico,  $\gamma_{\pm}$ , dados por Harned y Owen (1958), para estimar coeficientes de actividad de diversos iones a 25 °C, (el coeficiente de actividad de cada especie iónica concreta se ha estimado como el  $\gamma_{\pm}$  del ácido clorhídrico correspondiente a una disolución de la misma fuerza iónica y disolvente elevado al cuadrado de la carga de dicha especie (ecuación 11)).

Harned y Owen (1958) midieron  $\gamma_{\pm}$  a 25 °C, en función de la molalidad de HCl, en las mezclas de 0, 0.20, 0.45, 0.70 y 0.82 de fracción en peso de dioxano. La densidad de las mezclas agua-dioxano es muy similar a la del agua pura, con lo cual se puede hacer la aproximación de que las fracciones en peso y en volumen de dioxano son iguales. Nosotros hemos utilizado fracciones en volumen considerando que los valores de  $\gamma_{\pm}$  calculados por Harned y Owen referidos a fracciones en peso son los mismos para fracciones en volumen. Estos autores no calcularon  $\gamma_{\pm}$  en las mezclas de 0.4 y de 0.6 de fracción en peso de dioxano por lo que ha sido necesario realizar una interpolación gráfica para obtener estos valores.

Posteriormente, hemos obtenido una expresión matemática que describe adecuadamente el efecto de la fuerza iónica sobre el

logaritmo del coeficiente de actividad para cada composición del disolvente. Esta función, incluida en cada uno de los programas en que era necesaria, nos ha permitido, junto con la ecuación 11, un cálculo inmediato del coeficiente de actividad de cada especie iónica a una fuerza iónica y composición dadas. La función utilizada ha sido:

$$\log \gamma_{\pm} = -a \cdot m^{1/2} + b \cdot m + c \cdot m^2 + d \cdot m^3 \quad (I)$$

donde  $m$  es la molalidad del ácido clorhídrico, que coincide con la fuerza iónica en la escala molal, y  $a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$  son parámetros ajustables. Mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de esta ecuación a los datos de  $\gamma_{\pm}$  y  $m$  en cada mezcla agua-dioxano (agua, 0.2, 0.4 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano) se han obtenido los valores de  $a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$  correspondientes a cada composición de disolvente (tabla I). El ajuste se ha llevado a cabo utilizando el P.G.P. (descrito en la sección 3.4.) escribiendo la subrutina adecuada que, en este caso, es muy sencilla pues solo se trata de definir  $\gamma_{\pm}$  en función de la fuerza iónica. El valor máximo de  $m$  utilizado depende de la mezcla agua-dioxano considerada (0.1 para agua pura y la mezcla con un 0.2 de fracción en peso de dioxano, 0.07 para la mezcla del 0.4 y 0.05 para la del 0.6) ya que las concentraciones a las que se han realizado los experimentos, y por tanto, la fuerza iónica, son diferentes (figuras 5-8 y 18-21). para cada una de las mezclas agua-dioxano estudiadas. Como se puede observar en las figura I, las curvas ajustadas coinciden muy bien con los datos de Harned y

Owen.

Resumiendo, el método empleado para estimar los coeficientes de actividad ha sido el siguiente:

1. Interpolación gráfica de  $\log \gamma_{\pm}$  para las mezclas del 0.4 y 0.6 de fracción en peso de dioxano a partir de los datos de Harned y Owen.

2. Ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación I a los datos de  $\log \gamma_{\pm}$  en función de  $m$  para agua pura y las mezclas de 0.2, 0.4 y 0.6 de fracción en volumen de dioxano.

3. Introducción de la ecuación obtenida de  $\log \gamma_{\pm}$  en función de  $m$  para cada mezcla en el programa correspondiente: programa para obtener constantes de ionización (PLP) (sección 3. 4.), constantes de ionización y equilibrio (base de Schiff) (sección 4. 1. 4.), constante de ionización  $K_{3b}$  de la base de Schiff (sección 4. 2. 4.) y constantes cinéticas a partir de valoraciones potenciométricas (sección 6.).

Los datos de Harned y Owen van referidos a fracciones en peso de dioxano y fuerza iónica molal, pero, como hemos indicado previamente, nosotros hemos utilizado fracciones en volumen y fuerzas iónicas molares ya que la densidad de las mezclas agua-dioxano es muy similar a la del agua y, por tanto, se pueden aproximar fracciones en volumen a fracciones en peso y fuerzas iónicas molares a fuerzas iónicas molales. No obstante, hemos comprobando previamente que el error introducido con esta aproximación en la determinación de  $\log \gamma_{\pm}$  es pequeño, del orden de 0.001 (en el valor de  $\log \gamma_{\pm}$ ) en el caso más desfavorable.

TABLA I. Valores de los parámetros a, b, c y d obtenidos mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación I a los datos de  $\log \gamma_{\pm}$  (Harned y Owen, 1958) a 25 °C en mezclas agua dioxano.  $\Phi_D$  representa la fracción en volumen de dioxano de la mezcla.

$\Phi_D$	a	b	c	d
0	0.5125	0.7710	-1.833	4.120
0.2	0.7437	1.0175	-2.036	25.127
0.4	1.2850	2.2404	-8.435	99.370
0.6	3.4046	10.9557	-120.746	1031.120



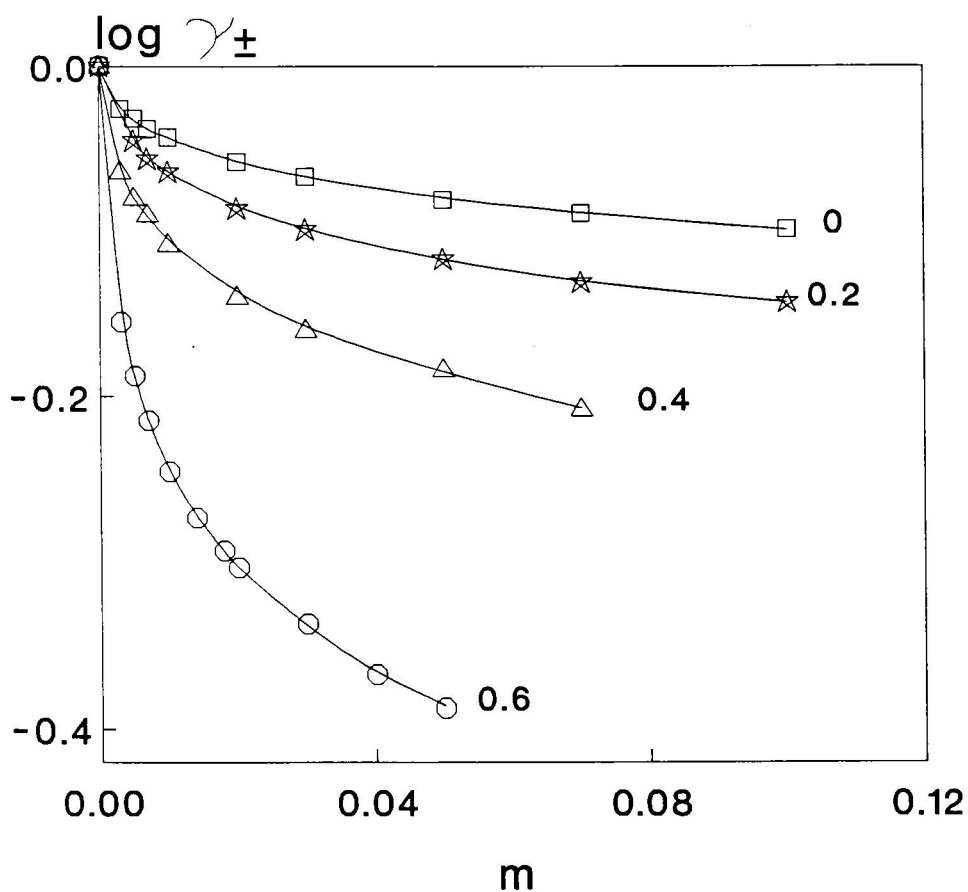


FIGURA I. Logaritmo del coeficiente de actividad iónico medio del ácido clorhídrico frente a la molalidad (fuerza iónica) a 25 °C en mezclas agua dioxano. Los símbolos representan los datos de Harned y Owen (1958). ( — ) curvas predichas por la ecuación I y los valores de a, b, c y d obtenidos en los ajustes (tabla I). En la figura se indica la fracción en volumen de dioxano de cada curva.



## APENDICE II



APENDICE II. 1. Código fuente de la subrutina incluida en el P.G.P. (sección 3. 4.) para obtener las constantes de ionización del PLP en agua a partir del ajuste de la ecuación 20 a los datos experimentales de pH y volumen. Esta subrutina es análoga a las utilizadas en mezclas agua-dioxano sustituyendo la sentencia ■ por la ecuación de  $\log \gamma_{\pm}$  en función de la fuerza iónica de la mezcla correspondiente.

```

/*.....PROGRAMA PARA AJUSTAR pKip EN AGUA.....*/
/*.....A PARTIR DE UNA VALORACION POTENCIOMETRICA.....*/
#include <math.h>
float usrfunc(x,npar,par,x1,x2)
int npar;
float x,par[],x1,x2;
{
float y;
double q,q1,q2,q3,q4,a,b,c,d,m,m2,m3,m4,i0,i,i2,i3,z,h;
double v,v1,g,g1,g5,g8,g9,co,ct,r,t1,t2,n,p,p0,p1,p2,p4,pi,dc;

/*.....INICIALIZACION.....*/
g=0;co=0;r=1;

```

```

/*.....PROCEDIMIENTO ITERATIVO.....*/
do
{
co=g;
t1=g+x;n=pow(10,-t1);
t2=x-g-14;z=pow(10,t2);
h=z-n;
m=pow(10,-x);
m2=m*m;m3=m*m*m;m4=m*m*m*m;
g1=pow(10,g);
g5=g1*g1*g1*g1*g1;g8=g5*g1*g1*g1;g9=g8*g1;
a=pow(10,-par[4]);b=a*pow(10,-par[3]);
c=b*pow(10,-par[2]);d=c*pow(10,-par[1]);
q1=m*g5/a;q2=m2*g8/b;q3=m3*g9/c;q4=m4*g8/d;q=1+q1+q2+q3+q4;
p0=1/q;p1=q1/q;p2=q2/q;p4=q4/q;p=3*p0+2*p1+p2-p4;

/*.....Cálculo del volumen.....*/
v=par[6]*(h+par[5]+par[7]*p)/(par[8]-h);

/*.....Cálculo de la fuerza iónica.....*/
v1=par[6]/(v+par[6]);
ct=par[7]*v1;
pi=6*p0+3*p1+p2;
dc=par[5]*v1;
i=z+ct*pi+dc;

```

```

/*.....Cálculo del coeficiente de actividad en agua....*/
i0=pow(i,0.5);i2=pow(i,2);i3=pow(i,3);
■ g=-0.5125*i0+0.771*i-1.8329*i2+4.12*i3;

/*.....CONDICION DE SALIDA.....*/
r=fabs(g-co);
}
while (r>0.001);

/* USER DEFINED FITTING FUNCTIONS
SHOULD RETURN Y DEFINED IN TERMS
OF X, FITTING PARAMETERS par[i]
AND EXPERIMENTAL PARAMETERS x1 and x2.
*/

/* USER SHOULD START WRITING USER FUNCTION AFTER THIS LINE */
y=v;

/* USER FUNCTION SHOULD END BEFORE THIS LINE */
return(y);
}

```

APENDICE II. 2. Código fuente de la subrutina incluida en el P.G.P. (sección 3. 4.) para obtener las constantes de ionización y de equilibrio de formación de la base de Schiff en la mezcla de 0.6 de fracción en volumen de dioxano a partir del ajuste de la ecuación 70 a los datos experimentales de pH y volumen. Esta subrutina es análoga a las utilizadas en agua y en mezclas agua-dioxano sustituyendo la sentencia ■ por la ecuación de  $\log \gamma_{\pm}$  en función de la fuerza iónica de la mezcla correspondiente.

```

/*.....PROGRAMA PARA AJUSTAR pKip, pKib Y pKm .....*/
/*.....EN LA MEZCLA DE 0.6 DE FRACCION EN VOLUMEN DE DIOXANO..*/
/*.....A PARTIR DE UNA VALORACION POTENCIOMETRICA.....*/
#include <math.h>
float usrfunc(x,npar,par,x1,x2)
int npar;
float x,par[],x1,x2;
{
float y;
double g,g1,g3,g4,g5,g8,g9,cg,rg,dv,cv,rv,v,v1,t1,t2,h,oh,ho,m;
double m2,m3,m4,d1,d2,d3,d4,qp1,qp2,qp3,qp4,qp,p0,p1,p2,p4,p,pt;
double kn,qa1,qa,a,e1,e2,qb3,qb2,qb,b1,b2,b3,b,bt,km,kh,kh1,kh2;
double kh3,kh4,ct,zp,zb,za,dc,i,ip,ib,i0,i2,i3,bpa,pa,k;

```



```

/*.....INICIALIZACION.....*/
g=0;cg=0;rg=1;dv=0;cv=0;rv=1;

/*.....PROCEDIMIENTO ITERATIVO.....*/
do
{
cg=g;cv=dv;
v=par[6]+dv;
t1=g+x;h=pow(10,-t1);
t2=x-g-par[12];oh=pow(10,t2);
ho=oh-h;
m=pow(10,-x);
m2=m*m;m3=m*m*m;m4=m*m*m*m;
g1=pow(10,g);
g3=g1*g1*g1;g4=g3*g1;g5=g4*g1;g8=g5*g1*g1*g1;g9=g8*g1;

/*.....Ecuaciones PLP.....*/
d4=pow(10,-par[10]);d3=d4*pow(10,-par[9]);
d2=d3*pow(10,-par[8]);d1=d2*pow(10,-par[7]);
qp1=m*g5/d4;qp2=m2*g8/d3;qp3=m3*g9/d2;
qp4=m4*g8/d1;qp=1+qp1+qp2+qp3+qp4;
p0=1/qp;p1=qp1/qp;p2=qp2/qp;p4=qp4/qp;p=3*p0+2*p1+p2-p4;

/*.....Ecuaciones AMINA.....*/
kn=pow(10,-par[11]);
qa1=m/(kn*g1);qa=1+qa1;a=qa1/qa;

```

/\*.....Ecuaciones BASE DE SHIFF.....\*/

$e2 = \text{pow}(10, -\text{par}[2]); e1 = e2 * \text{pow}(10, -\text{par}[1]);$   
 $qb2 = g3 * m / e2; qb3 = g4 * m2 / e1; qb = 1 + qb3 + qb2;$   
 $b1 = 1 / qb; b2 = qb2 / qb; b3 = qb3 / qb; b = b2 + 2 * b1;$

/\*.....KpH.....\*/

$km = \text{pow}(10, -\text{par}[3]);$   
 $kh = qb * m * km * g5 / (qp * qa);$

/\*.....Concentracion de BASE DE SCHIFF.....\*/

$v1 = \text{par}[6] / (\text{par}[6] + dv);$   
 $ct = (x1 / 1000) * v1;$   
 $kh1 = 1 / kh; kh2 = \text{pow}(kh1, 2); kh3 = kh2 / 4 + ct * kh1; kh4 = \text{pow}(kh3, 0.5);$   
 $bt = kh1 / 2 + ct - kh4;$

/\*.....Carga Total.....\*/

$pt = ct - bt;$   
 $zp = pt * p; zb = bt * b; za = pt * a;$   
 $k = ho + ct + zp + zb - za;$

/\*.....Cálculo de la fuerza iónica.....\*/

$ip = pt * (6 * p0 + 3 * p1 + p2);$   
 $ib = bt * (3 * b1 + b2);$   
 $dc = (\text{par}[5] / 10000) * v1;$   
 $i = oh + ct + ip + ib + dc;$

```

/*.....Coeficiente de actividad en la mezcla del 0.6.....*/
i0=pow(i,0.5);i2=pow(i,2);i3=pow(i,3);
■ g=-3.4046*i0+10.9557*i-120.746*i2+1031.12*i3;

/*.....Número de moles totales, delta v.....*/
dv=fabs(k*v/(par[4]/100));

/*.....CONDICION DE SALIDA.....*/
rg=fabs(g-cg);
rv=fabs(dv-cv);
}
while ((rg>0.0001) && (rv>0.0001));

bpa=bt*(b-p+a);pa=1+p-a;

/* USER DEFINED FITTING FUNCTIONS
SHOULD RETURN Y DEFINED IN TERMS
OF X, FITTING PARAMETERS par[i]
AND EXPERIMENTAL PARAMETERS x1 and x2.
*/

/* USER SHOULD START WRITING USER FUNCTION AFTER THIS LINE */
y=par[6]*(ho+(x1/1000)*pa+bpa+(par[5]/10000))/((par[4]/100)-ho-bpa
);
/* USER FUNCTION SHOULD END BEFORE THIS LINE */
return(y);
}

```

APENDICE II. 3. Código fuente de la subrutina incluida en el P.G.P. (sección 3. 4.) para obtener la constante de ionización  $K_{3b}$  en la mezcla de 0.2 de fracción en volumen de dioxano a partir del ajuste de la ecuación 94 a los datos experimentales de absorbancia y pH. Esta subrutina es análoga a las utilizadas en agua y en mezclas agua-dioxano sustituyendo la sentencia ■ por la ecuación de  $\log \gamma_{\pm}$  en función de la fuerza iónica de la mezcla correspondiente.

```

/*.....PROGRAMA PARA AJUSTAR pK3b.....*/
/*.....EN LA MEZCLA DE 0.2 DE FRACCION EN VOLUMEN DE DIOXANO.*/
/*.....A PARTIR DE UNA VALORACION ESPECTROFOTOMETRICA.....*/
#include <math.h>

float usrfunc(x,npar,par,x1,x2)

int npar;

float x,par[],x1,x2;

{
float y,f;

int q;

double g,g1,g3,g4,g5,g8,g9,cg,rg,t1,t2,h,oh,ho,m,m2,m3,m4,p0;

double pt,ptt,kn,qa1,qa,a,a0,at,e3,qb1,qb,b1,b0,bt,ex0,ex1;

double ex2,r1,r2,r,km,kh,i,ip,ib,i0,i2,i3,i4,cl,cl1;

ex0=1000*par[2];ex1=1000*par[3];ex2=1000*par[4];

```

```
/*.....FACTOR DE DILUCION.....*/
```

```
q=x1;
```

```
if (q==10)
```

```
{
```

```
if (fabs(x-10.03)<0.1) f=.9972;
```

```
else if (fabs(x-10.39)<0.1) f=0.9950;
```

```
else if (fabs(x-10.67)<0.1) f=0.9934;
```

```
else if (fabs(x-10.84)<0.1) f=0.9920;
```

```
else if (fabs(x-11.01)<0.1) f=0.9908;
```

```
else if (fabs(x-11.51)<0.1) f=0.9898;
```

```
else if (fabs(x-11.85)<0.1) f=0.9882;
```

```
else if (fabs(x-12.07)<0.1) f=0.9860;
```

```
else if (fabs(x-12.40)<0.1) f=0.9822;
```

```
else if (fabs(x-12.71)<0.1) f=0.9734;
```

```
else if (fabs(x-13.02)<0.1) f=0.9518;
```

```
else if (fabs(x-13.46)<0.1) f=0.8990;
```

```
else if (fabs(x-13.80)<0.1) f=0.7534;
```

```
}
```

```
else if (q==30)
```

```
{
```

```
if (fabs(x-10.11)<0.1) f=.9932;
```

```
else if (fabs(x-10.63)<0.1) f=0.9910;
```

```
else if (fabs(x-11.10)<0.1) f=0.9766;
```

```
else if (fabs(x-11.44)<0.1) f=0.9734;
```

```
else if (fabs(x-11.78)<0.1) f=0.9708;
```

```
else if (fabs(x-12.06)<0.1) f=0.9684;
```

```
else if (fabs(x-12.2)<0.1) f=0.9666;
```

```

else if (fabs(x-12.49)<0.1) f=0.9622;
else if (fabs(x-12.76)<0.1) f=0.9548;
else if (fabs(x-12.99)<0.1) f=0.9494;
else if (fabs(x-13.24)<0.1) f=0.9246;
else if (fabs(x-13.47)<0.1) f=0.8794;
else if (fabs(x-13.70)<0.1) f=0.7984;
else if (fabs(x-13.9)<0.1) f=0.6774;
else if (fabs(x-14.05)<0.05) f=0.5072;
}
at=(x1*f)/1000;pt=(x2*f)/100000;
if (q==10) c11=0.01;
else if (q==30) c11=0.03;
cl=c11*f;

/*.....INICIALIZACION.....*/
g=0;cg=0;rg=1;

/*.....PROCEDIMIENTO ITERATIVO.....*/
do
{
cg=g;
t1=g+x;h=pow(10,-t1);
t2=x-g-14.59;oh=pow(10,t2);
ho=oh-h;
m=pow(10,-x);
m2=m*m;m3=m*m*m;m4=m*m*m*m;
g1=pow(10,g);

```

$g3=g1*g1*g1;g4=g3*g1;g5=g4*g1;g8=g5*g1*g1*g1;g9=g8*g1;$

*/\*.....Ecuaciones AMINA.....\*/*

$kn=pow(10,-10.37);$

$qa1=m/(kn*g1);qa=1+qa1;a=qa1/qa;a0=1/qa;$

*/\*.....Ecuaciones BASE DE SHIFF.....\*/*

$e3=pow(10,-par[1]);$

$qb1=m*g5/e3;qb=1+qb1;$

$b0=1/qb;b1=qb1/qb;$

*/\*.....KpH.....\*/*

$km=pow(10,-par[5]);$

$kh=qb*m*km*g5*b0/(qa*b1);$

*/\*..... Concentracion de BASE DE SCHIFF.....\*/*

$bt=kh*at*pt/(1+kh*at);$

$ptt=pt-bt;$

*/\*.....CALCULO FUERZA IONICA.....\*/*

$ip=ptt*6;$

$ib=bt*(3*b1+6*b0);$

$i=oh+ip+ib+cl;$

*/\*.....COEFICIENTE DE ACTIVIDAD EN LA MEZCLA DEL 0.2.....\*/*

$i0=pow(i,0.5);i2=pow(i,2);i3=pow(i,3);i4=pow(i,4);$

■  $g=-0.7437*i0+1.01752*i-1.01752*i2-0.6329*i3+4.26255*i4;$

```

/*.....CONDICION DE SALIDA.....*/
rg=fabs(g-cg);
}
while (rg>0.001);

r1=e3/(g5*m);r2=km*g5*m*at*a0;
r=1+r1+1/r2;

/* USER DEFINED FITTING FUNCTIONS
SHOULD RETURN Y DEFINED IN TERMS
OF X, FITTING PARAMETERS par[i]
AND EXPERIMENTAL PARAMETERS x1 and x2.
*/

/* USER SHOULD START WRITING USER FUNCTION AFTER THIS LINE */
y=pt*((ex0/(r2*r))+(ex1/r)+((ex2*r1)/r));
/* USER FUNCTION SHOULD END BEFORE THIS LINE */
return(y);
}

```



APENDICE II. 4. Código fuente de la subrutina incluida en el P.G.P. para obtener las constantes cinéticas individuales,  $k_1^i$ , en mezclas agua-dioxano a partir del ajuste de la ecuación 132 a los datos de  $k_1$  y pH.

```

/*....PROGRAMA PARA AJUSTAR LOG k1i EN MEZCLAS AGUA-DIOXANO.....*/
#include <math.h>
float usrfunc(x,npar,par,x1,x2)
int npar;
float x,par[],x1,x2;
{
float y;
int q;
double g,g1,g3,g4,g5,g8,g9,t1,t2,h,oh,m,m2,m3,m4,d1,d2,d3,d4,qp1;
double qp1,qp2,qp3,qp4,qp,p0,p1,p2,p3,p4,p,pt,kn,qa1,qa,a,a1;
double l0,l1,l2,l3,l10,l11,l12,l13;

/*..COEFICIENTE DE ACTIVIDAD A I=0.01 EN MEZCLAS AGUA-DIOXANO..*/
q=x1;
if (q==0) g=-0.043447;
    else if (q==20) g=-0.06449;
    else if (q==40) g=-0.108;
    else if (q==60) g=-0.246;

```

```

t1=g+x;h=pow(10,-t1);
t2=x-g-par[9];oh=pow(10,t2);
m=pow(10,-x);
m2=m*m;m3=m*m*m;m4=m*m*m*m;
g1=pow(10,g);
g3=g1*g1*g1;g4=g3*g1;g5=g4*g1;g8=g5*g1*g1*g1;g9=g8*g1;

```

```

/*.....Ecuaciones PLP.....*/

```

```

d4=pow(10,-par[8]);d3=d4*pow(10,-par[7]);
d2=d3*pow(10,-par[6]);d1=d2*pow(10,-par[5]);
qp1=m*g5/d4;qp2=m2*g8/d3;qp3=m3*g9/d2;
qp4=m4*g8/d1;qp=1+qp1+qp2+qp3+qp4;
p0=1/qp;p1=qp1/qp;p2=qp2/qp;p3=qp3/qp;
p4=qp4/qp;p=3*p0+2*p1+p2-p4;

```

```

/*.....Ecuaciones AMINA.....*/

```

```

kn=pow(10,-par[10]);
qa1=m/(kn*g1);qa=1+qa1;a1=qa1/qa;a=1/qa;

```

```

/*.....CALCULO DE LOG k1.....*/

```

```

l0=pow(10,par[1]);l1=pow(10,par[2]);
l2=pow(10,par[3]);l3=pow(10,par[4]);
l10=l0*p0;l11=l1*p1;l12=l2*p2;l13=l3*p3;

```

```

/* USER DEFINED FITTING FUNCTIONS
SHOULD RETURN Y DEFINED IN TERMS
OF X, FITTING PARAMETERS par[i]

```

AND EXPERIMENTAL PARAMETERS x1 and x2.

\*/

/\* USER SHOULD START WRITING USER FUNCTION AFTER THIS LINE \*/

y=log10(a)+log10(l10+l11+l12+l13);

/\* USER FUNCTION SHOULD END BEFORE THIS LINE \*/

return(y);

}

APENDICE II. 5. Código fuente de la subrutina incluida en el P.G.P. para obtener las constantes cinéticas individuales,  $k_2^1$ , en mezclas agua-dioxano a partir del ajuste de la ecuación 136 a los datos de  $k_1$  y pH.

```
/*....PROGRAMA PARA AJUSTAR LOG k2i EN MEZCLAS AGUA-DIOXANO ....*/
#include <math.h>
float usrfunc(x,npar,par,x1,x2)
int npar;
float x,par[],x1,x2;
{
float y;
int q;
double g,g1,g3,g4,g5,g8,g9,cg,rg,dv,cv,rv,v,t1,t2,h,oh,m,m2,m3,m4;
double e1,e2,qb3,qb2,qb,b1,b2,b3,b,10,11,12,13,110,111,112,113;

/*..COEFICIENTE DE ACTIVIDAD A I=0.01 EN MEZCLAS AGUA-DIOXANO..*/
q=x1;
if (q==0) g=-0.043447;
    else if (q==20) g=-0.06449;
    else if (q==40) g=-0.108;
    else if (q==60) g=-0.246;
    t1=g+x;h=pow(10,-t1);
```

```

t2=x-g-par[7];oh=pow(10,t2);
m=pow(10,-x);
m2=m*m;m3=m*m*m;m4=m*m*m*m;
g1=pow(10,g);
g3=g1*g1*g1;g4=g3*g1;g5=g4*g1;g8=g5*g1*g1*g1;g9=g8*g1;

/*.....Ecuaciones BASE DE SHIFF.....*/
e2=pow(10,-par[6]);e1=e2*pow(10,-par[5]);
qb2=g3*m/e2;q3=g4*m2/e1;q3=1+qb3+qb2;
b1=1/q3;b2=q3/q3;b3=q3/q3;b=b2+2*b1;

/*.....CALCULO DE LOG k2.....*/
l0=pow(10,par[1]);l1=pow(10,par[2]);
l2=pow(10,par[3]);l3=pow(10,par[4]);
l10=l0*b1;l11=l1*b2;l12=l2*b3;l13=l3*b1*oh;

/* USER DEFINED FITTING FUNCTIONS
SHOULD RETURN Y DEFINED IN TERMS
OF X, FITTING PARAMETERS par[i]
AND EXPERIMENTAL PARAMETERS x1 and x2.

*/

/* USER SHOULD START WRITING USER FUNCTION AFTER THIS LINE */
y=log10(l10+l11+l12+l13);
/* USER FUNCTION SHOULD END BEFORE THIS LINE */
return(y);
}

```



## GLOSARIO DE SIMBOLOS





En este apartado se recogen los símbolos más utilizados en esta Memoria. Alguno de ellos se ha empleado para designar dos magnitudes distintas; creemos que no hay posibilidad de confusión ya que, en estos casos, dichas magnitudes aparecen en contextos muy diferentes.

a. Concentración inicial de PLP ó n-hexilamina en una valoración potenciométrica.

$a_{a0}$ ,  $a_{a1}$ ,  $a_{ai}$ . Actividad de la especie iónica de la n-hexilamina con i protones lábiles en la escala molar.

$a_{b0}$ , ...,  $a_{b3}$ ,  $a_{bi}$ . Actividad de la especie iónica de la base de Schiff con i protones lábiles en la escala molar.

$a_H$ . Actividad de los iones  $H^+$  en la escala molar.

$a_{p0}$ ,  $a_{p4}$ ,  $a_{pi}$ . Actividad de la especie iónica del PLP con i protones lábiles en la escala molar.

$a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_i$ . Fracción de la especie iónica de la n-hexilamina con i protones lábiles referida a la concentración total de n-hexilamina.

A. Absorbancia a una longitud de onda dada en un instante  $t$ .

$A_0$ . Absorbancia inicial a una longitud de onda dada.

$A_\infty$ . Absorbancia en el equilibrio a una longitud de onda dada.

$A_0, A_1, A_2$ . Especie iónica de la *n*-hexilamina con  $i$  protones lábiles.

b. Concentración de la disolución valorante de KOH.

$b_0, \dots, b_3, b_i$ . Fracción de la especie iónica de la base de Schiff con  $i$  protones lábiles referida a la concentración total de base de Schiff.

B. Lectura del pH-metro.

$B_0, \dots, B_4, B_i$ . Especie iónica de la base de Schiff con  $i$  protones lábiles.

$c_a, c_b, c_p$ . Concentración de amina, base de Schiff y PLP, respectivamente, en un instante  $t$ .

$c_{af}, c_{bf}, c_{pf}, c_f$ . Concentración de amina, base de Schiff y PLP, respectivamente, en el equilibrio.

$c_{a0}$ ,  $c_{b0}$ ,  $c_{p0}$ . Concentración de amina, base de Schiff y PLP, respectivamente, en el instante inicial de una cinética.

$c_t$ . Concentración total (suma de la concentración total de PLP y de base de Schiff) en una valoración potenciométrica o espectrofotométrica.

$f_{b0}$ , ...,  $f_{b3}$ ,  $f_{bi}$ . Fracción de la especie iónica de la base de Schiff con  $i$  protones lábiles referida a la concentración total ( $c_t$ ).

$f_{bt}$ . Fracción total de las especies iónicas de base de Schiff ( $\sum f_{bi}$ ) referida a la concentración total ( $c_t$ ).

$f_{p0}$ , ...,  $f_{p3}$ ,  $f_{pi}$ . Fracción de la especie iónica del PLP con  $i$  protones lábiles referida a la concentración total ( $c_t$ ).

$f_{pt}$ . Fracción total de las especies iónicas de PLP ( $\sum f_{pi}$ ) referida a la concentración total ( $c_t$ ).

$i$ . Número de protones lábiles de una especie iónica.

$I$ . Fuerza iónica molar.

$I_b$ . Fuerza iónica aportada por la base de Schiff por molécula.

$I_p$ . Fuerza iónica aportada por el PLP por molécula.

$k_{ap}$ . Constante cinética aparente de velocidad de primer orden.

$k_1$ . Constante cinética aparente de formación.

$k_2$ . Constante cinética aparente de hidrólisis.

$k_1^0, \dots, k_1^3, k_1^i$ . Constante de velocidad individual de formación de la base de Schiff a partir de la reacción de la especie iónica del PLP con  $i$  protones lábiles con la especie sin protonar de la amina.

$k_2^1, \dots, k_2^3, k_2^i$ . Constante de velocidad individual de hidrólisis de la especie iónica de la base de Schiff con  $i$  protones lábiles.

$k_2^{OH}$ . Constante de velocidad de hidrólisis de la reacción entre la especie iónica de la base de Schiff con un protón lábil y  $OH^-$ .

$K_{f0}, \dots, K_{f3}, K_{fi}$ . Constante de equilibrio de formación de la especie iónica de la base de Schiff con  $i$  protones lábiles a partir de la especie del PLP con el mismo número de protones y la especie sin protonar de la amina.

$K_M$ . Constante de equilibrio de formación de la especie de la base de Schiff con un protón lábil a partir de las especies sin protonar del PLP y la n-hexilamina.

$K_N$ . Constante de equilibrio de ionización de la n-hexilamina.

$K_{pH}$ . Constante de equilibrio aparente de formación de la base de Schiff.

$K_{pH}^0$ . Constante de equilibrio aparente de formación de la base de Schiff calculada a fuerza iónica cero.

$K_w$ . Constante de autoprotólisis del agua.

$K_{0b}, \dots, K_{3b}, K_{1b}$ . Constantes de equilibrio de ionización macroscópicas de la base de Schiff.

$K_{1p}, \dots, K_{4p}, K_{ip}$ . Constantes de equilibrio de ionización macroscópicas del PLP.

l. Espesor de la muestra atravesada por la luz.

m. Molalidad.

n. Número de moles de KOH en una valoración potenciométrica.

n. Número de parámetros ajustables.

N. Número de puntos al realiza un ajuste no lineal de mínimos cuadrados.

$P_0, \dots, P_4, p_i$ . Fracción de la especie iónica del PLP con i protones lábiles referida a la concentración total de PLP.

$P_0, \dots, P_4, P_i$ . Especie iónica del PLP con i protones lábiles.

$P_0$ . Valor de un parámetro correspondiente al mejor ajuste.

$$\text{pH} = - \log a_{\text{H}}$$

$\text{pH}_f$ . pH cuando se alcanza el equilibrio tras la adición de KOH en la valoración potenciométrica de PLP+n-hexilamina+base de Schiff en equilibrio (sección 6).

$\text{pH}_0$ . pH en el instante inicial tras la adición de KOH en la valoración potenciométrica de PLP+n-hexilamina+base de Schiff en equilibrio (sección 6).

$\Delta\text{pH}$ . Variación del pH con respecto al  $\text{pH}_f$  en un instante t en la valoración potenciométrica de PLP+n-hexilamina+base de Schiff en equilibrio (sección 6).

$\Delta pH_0$ . Variación del pH con respecto al  $pH_f$  en  $t=0$  en la valoración potenciométrica de PLP+n-hexilamina+base de Schiff en equilibrio (sección 6).

$$pK_{1b}, \dots, pK_{3b}, pK_{ib} = -\log K_{ib}.$$

$$pK_{1p}, \dots, pK_{4p}, pK_{ip} = -\log K_{ip}.$$

$pK^i$ . pK macroscópico de la especie iónica del PLP con  $i$  protones lábiles.

$$pK_M = -\log K_M.$$

$$pK_N = -\log K_N.$$

$$pK_w = -\log K_w.$$

$q$ . Carga de una especie iónica.

$Q_a$ . Carga aportada por la n-hexilamina por molécula.

$Q_b$ . Carga aportada por la base de Schiff por molécula.

$Q_p$ . Carga aportada por el PLP por molécula.

$Q_{pa}$ . Ver sección 4. 1. 1. (ecuación 63).

$Q_{pba}$ . Ver sección 4. 1. 1. (ecuación 64).

R. Ver sección 4. 2. 1. (ecuación 90).

$R_1$ . Ver sección 4. 2. 1. (ecuación 88).

$R_2$ . Ver sección 4. 2. 1. (ecuación 89).

t. Tiempo.

U. Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste realizado fijando el parámetro, cuyo intervalo de Bevington se quiere determinar, en el valor  $P_0 + \Delta p$ .

$U_H$ . Factor de corrección para la obtención de la concentración estequiométrica molar de protones.

$U_H^0$ . Factor de corrección para la obtención de la actividad de protones en la escala molar.

$U_0$ . Suma de cuadrados de desviaciones del ajuste óptimo.

v. Volumen de KOH añadido en el transcurso de una valoración potenciométrica.

$v_0$ . Volumen inicial de la disolución de PLP o de PLP+n-hexilamina+base de Schiff en equilibrio, en una valoración



potenciométrica.

$v_1$ . Velocidad de la reacción de formación de base de Schiff.

$v_2$ . Velocidad de la reacción de hidrólisis de base de Schiff.

$x$ . Concentración de PLP que ha reaccionado en un instante  $t$  (sección 5).

$x$ . Variación de la concentración de PLP, amina o base de Schiff respecto de la concentración final en un instante  $t$  (sección 6).

$x_e$ . Concentración de PLP que ha reaccionado cuando se alcanza el equilibrio (sección 5).

$x_0$ . Variación de la concentración de PLP, amina o base de Schiff respecto de la concentración final en un instante  $t=0$  (sección 6).

$Z_a$ . Ver sección 4. 1. 1. (ecuación 49).

$Z_b$ . Ver sección 4. 1. 1. (ecuación 46).

$Z_p$ . Ver sección 3. 1. (ecuación 18).

$Z_{a0}$ ,  $Z_{a1}$ ,  $Z_{a1}$ . Ver sección 4. 1. 1. (ecuaciones 47 y 48).

$Z_{b1}, \dots, Z_{b3}, Z_{bi}$ . Ver sección 4. 1. 1. (ecuaciones 43-45).

$Z_{p0}, \dots, Z_{p4}, Z_{pi}$ . Ver sección 3. 1. (ecuaciones 13-17).

$\epsilon_p, \epsilon_b$ . Coeficiente de extinción molar del PLP y de la base de Schiff, respectivamente, a una longitud de onda, pH y composición del disolvente dados.

$\epsilon_{b0}, \epsilon_{b1}, \epsilon_{p0}$ . Coeficiente de extinción molar de las especies  $B_0, B_1$  y  $P_0$ , respectivamente, a una longitud de onda, pH y composición del disolvente dados.

$\phi_D$ . Fracción en volumen de dioxano de una mezcla agua-dioxano.

$\gamma_{a0}, \gamma_{a1}, \gamma_{ai}$ . Coeficiente de actividad de la especie iónica de la n-hexilamina con i protones lábiles en la escala molar.

$\gamma_{b0}, \dots, \gamma_{b3}, \gamma_{bi}$ . Coeficiente de actividad de la especie iónica de la base de Schiff con i protones lábiles en la escala molar.

$\gamma_H$ . Coeficiente de actividad del protón.

$\gamma_{p0}, \dots, \gamma_{p4}, \gamma_{pi}$ . Coeficiente de actividad de la especie iónica del PLP con i protones lábiles en la escala molar.

$\gamma_{\pm}$ . Coeficiente de actividad iónico medio del ácido clorhídrico.

$\lambda$ . Longitud de onda.

$\tau$ . Tiempo de relajación.

**DILIGENCIA:**

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
la fecha, constituido por:

- D. Manuel Cortijo Mérida
- D. Manuel M. Domínguez Pérez
- D. Pedro Luis Mateo Alarcón
- D. Manuel Blázquez Ruiz
- D. Enrique López-Cantarero Vargas

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Doña  
Isabel M<sup>a</sup> Plaza del Pino

se acordó por Unanimidad otorgar la califica-  
ción de Apto - CUM LAUDE

y para que conste, se extiende firmada por los  
componentes del Tribunal, la presente diligen-  
cia.

Granada, a 2 de Julio de 1990.

El Secretario,

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

H. Domínguez