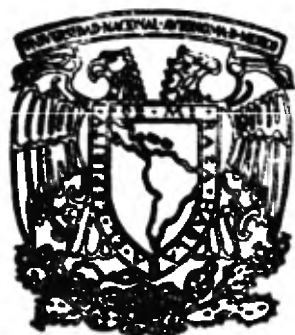


Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**METODOLOGIA UTILIZADA ACTUALMENTE EN LA
DETERMINACION DE IONES METALICOS
EN SUEROS SANGUINEOS**

(TRABAJO MONOGRAFICO MANCOMUNADO)

ENRIQUEZ

GUERRERO

LETICIA

ENRIQUEZ

GUERRERO

SARA

QUIMICO

FARMACEUTICO

BIOLOGO

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
CAPITULO I.	1
Introducción y Objetivo.	1
CAPITULO II. Generalidades.	7
Elementos.	10
Espectrofotometría. (Colorimetría).	23
Espectrofotometría de Emisión de Llama.	45
Espectrofotometría de Absorción Atómica.	54
CAPITULO III. Técnicas.	
Toma y manejo de muestra.	66
Técnicas.	71
CAPITULO IV. Datos.	84
CAPITULO V. Conclusiones.	89
CAPITULO VI. Bibliografía.	93

CAPITULO I
Introducción y Objetivo

INTRODUCCION Y OBJETIVO.

Día a día continúa el progreso de la medicina de laboratorio y de la tecnología médica, y resulta cada vez menor el tiempo que transcurre entre un descubrimiento y su aplicación; así pues las casas comerciales de equipos de laboratorio elaboran casi de igual manera los aparatos y reactivos necesarios.

Por lo tanto la instrumentación a venido a ser de gran valía para las múltiples determinaciones que se efectúan en el laboratorio clínico para detectar un rápido y certero diagnóstico de anomalías médicas.

Es bién reconocido por todos, que la calidad sensibilidad y precisión de las determinaciones en el laboratorio clínico han sido incrementadas gracias a la automatización de los métodos manuales, y al mismo tiempo eliminan muchas fatigas y errores humanos, debido a los excedentes de trabajo. También reduce al mínimo el tiempo en el cual se efectúan las pruebas de laboratorio; éste factor: tiempo, tan importante en clí-

nica, ha sido resuelto con la introducción de instrumentación avanzada, como lo es el Auto-Analyser, que nos permite efectuar actualmente de 12 a 16 determinaciones distintas, aisladas y simultáneamente, a una velocidad de 60 por hora.

Es importante señalar que vivimos la era de la automatización, no sólo en instrumentación, computación, etc., sino que también el hombre ha dejado de ser un individuo que razona, que piensa, para convertirse en una máquina más. Una máquina que se limita a oprimir un botón, o mover una palanca, olvidándose de la maravillosa capacidad que tenemos de poder saber que es lo que está pasando al accionar ese botón o esa palanca y recordar que toda esa maquinaria ha sido hecha por el hombre para el hombre, y no contra el hombre; movidos por este pensamiento hemos querido que este trabajo tenga como objetivo principal presentar la importancia que tiene, el tener un conocimiento no sólo fundamental y básico del manejo y empleo de la instrumentación tan amplia que tenemos a nuestro alcance, sino enfatizar en -

la importancia de los conocimientos básicos del Análisis Instrumental al profesional de la Química Clínica - para que mejore las determinaciones de los diversos fluidos biológicos; ya que desde los primeros espectrofotómetros y aparatos de medición que aparecieron en el comercio hasta los modernos autoanalizadores, están basados en los mismos principios teóricos.

Así el químico clínico está o debe de estar capacitado para evitar errores y solucionar posibles fallas sencillas en los aparatos, además de llevar un verdadero control de calidad en cada una de las determinaciones.

Generalmente el Químico Clínico tiene conocimientos de Bioquímica, Biología, Fisicoquímica, Química Clínica, etc.; pero se encuentra deficiente en conceptos básicos para el buen uso y manejo de los aparatos con que se trabaja diariamente, debido a las pocas oportunidades que tiene de usar los instrumentos en su formación profesional. Por lo tanto si no se utilizan correctamente y se mantienen en buen estado los aparatos

por el profesional, va en perjuicio de las determinaciones efectuadas.

El conocimiento de una cosa en sí, se alcanza conjuntamente mediante la teoría y el experimento, y vemos que en el laboratorio clínico el profesional se habita, de hecho, a manejar un instrumento, provocando — así aproximadamente el 80% de los errores que se tienen en el laboratorio, llevandonos a resultados erróneos — que repercuten directamente en el paciente, debido a — que resultados falsos conducen a un diagnóstico erróneo y por lo tanto a un tratamiento igualmente erróneo. Este alto porcentaje de errores es debido a la falta de — conocimiento y de un entendimiento básico del equipo — que se utiliza, de aquí la importancia de los dos principios arriba señalados.

Habiendo observado lo anterior nos permitimos presentar éste trabajo haciendo uso de algunos métodos — espectrofotométricos para efectuar determinaciones de — iones (Na, Cl, K, Ca, Mg) en sueros sanguíneos, tomando en cuenta las especificaciones que se hacen al respecto,

con el objeto de obtener resultados veraces, así como un control de calidad adecuado.

C A P I T U L O I I**Generalidades**

GENERALIDADES

Los métodos de análisis utilizados en Química Clínica se dividen básicamente en dos grupos:

El Análisis Cualitativo, que podemos definir lo como la identificación por medios químicos de las sustancias que tenemos en una mezcla. En el laboratorio clínico se utiliza éste tipo de análisis para determinar la presencia de componentes anormales en sangre, orina, heces, etc.

El Análisis Cuantitativo, que es la medición de la cantidad de una sustancia específica que se encuentra en la muestra; éstos métodos cuantitativos nos permiten conocer la concentración de las distintas sustancias que se encuentran en los diferentes líquidos orgánicos.

Entre los métodos cuantitativos tenemos la Gravimetría, la Volumetría y la Colorimetría. En éste trabajo haremos énfasis en la Colorimetría, donde una sustancia problema se somete a una reacción química -

cuyo producto final es coloreado. La intensidad del color de la solución final depende de la cantidad de — sustancia presente en la solución original.

Prácticamente los métodos instrumentales más utilizados en el laboratorio clínico de rutina son la Espectrofotometría, la Potometría de Llama y la Fluorometría. Siendo el primer método: la Espectrofotometría la que ocupa un lugar primordial, ya que es la más utilizada en las determinaciones que se efectúan en el laboratorio clínico.

Básicamente la Colorimetría y la Espectrofotometría, se fundamentan en las propiedades que poseen los átomos y moléculas para absorber o emitir la energía electromagnética en una de las muchas áreas del espectro electromagnético total.

ELEMENTOS

ANTECEDENTES

Los datos de Laboratorio son esenciales para la detección y tratamiento adecuados de los trastornos del balance hídrico, electrolítico ácido-base y del oxígeno.

Con los instrumentos de precisión con que contamos hoy en día es posible la determinación de las variantes esenciales, con facilidad, rapidez y exactitud.

Los electrólitos son componentes esenciales de toda la materia viva y desempeñan múltiples papeles en el cuerpo humano y casi no hay ningún proceso metabólico, que no dependa o no sea afectado por electrólitos; dentro de sus muchas funciones se encuentra el mantenimiento de la presión osmótica, la hidratación de los diversos compartimentos líquidos del cuerpo, regulación de la función normal del corazón y otros músculos; también intervienen en reacciones de oxidación-reducción y participan como parte esencial o cofactores de enzimas.

Los electrólitos se clasifican como aniones- o como cationes, según que emigren en un campo eléctrico hacia el ánodo o hacia el cátodo, esto se significa- según la carga negativa o positiva que tengan.

Entre los electrólitos mayores figuran: sodio potasio, calcio y cloro, estos se encuentran como io- nes libres a diferencia de los electrólitos menores — que solo los encontramos en alguna combinación espe- cial con proteína y es por esta razón que comunmente se clasifican aparte.

SODIO

El sodio es el principal catión del líquido extracelular. El requerimiento diario en la dieta nor- mal contiene aproximadamente de 8 a 15 gramos de cloru ro sódico, que es casi completamente absorbido en el tracto gastrointestinal, el exceso es eliminado por los riñones que vienen siendo los reguladores últimos del contenido de sodio del cuerpo.

La filtración inicial del sodio es por los--

glomérulos y luego es resorbido en un 80 a 85 % en la porción proximal y también en cierto grado en la porción distal de los túbulos. La resorción se ve afectada grandemente por hormonas corticoadrenales.

Alimentos con alto contenido de Sodio: pan, maíz, arroz hojuelas de trigo, arroz inflado, galletas saladas, legumbres enlatadas en salmuera, pescado seco, mariscos- carnes tales como tocino, cecina, jamón, puerco salado salchichas, queso, leche en polvo, aceitunas, catsup - y algunas otras salsas sazonadoras.

ALTERACIONES

El bajo nivel de sodio en suero denominado hiposodemia se puede deber a diferentes condiciones como son: la pérdida de orina en cantidades que exceden a la normal, como generalmente se ve en diabetes sacarina; en la enfermedad de Addison, que se caracteriza por la disminución en la secreción de algunas hormonas causando disminución de la resorción de sodio por los túbulos y esto a su vez provoca pérdida de sodio del--

suero; también hay una baja considerable de sodio, cuando hay diarrea, pues se pierde una cantidad excesiva - de sodio con las heces fecales; y en enfermedad tubular renal.

Hablamos de hipersodemia, cuando se encuentra el nivel aumentado de sodio en suero como en el -- síndrome de Cushing o hiperadrenalismo, en el cual hay aumento de la producción de corticosteroides y por lo tanto aumento en la absorción de sodio por los túbulos renales. Hay aumento relativo de sodio en suero en una deshidratación grave, debido esto, a pérdida primaria de agua. Encontramos también aumento de sodio en coma diabético; en ciertos tipos de daños cerebrales, y en un tratamiento excesivo con sales sódicas.

POTASIO

El potasio es el mayor catión intracelular.- El balance de potasio en el adulto se mantiene con una ingesta media de en la dieta de 80 a 200 miliequivalentes por día; la mínima necesidad diaria es de aproximada

-damente de 30 miliequivalentes. Estos requerimientos de potasio para el cuerpo se satisfacen con una dieta normal.

El potasio una vez absorbido por el tracto-- intestinal, es eliminado parcialmente del plasma por - filtración glomerular, y luego es casi resorbido por - completo por los túbulos, para en seguida ser elimina- do por los túbulos distales.

Hiperpotasemia.- Se presenta cuando todo po- tasio resorbido por el tracto intestinal causa solo un aumento leve y temporal en los niveles de potasio en - suero; solo una parte de éste potasio emigra a los eri- trocitos, y el resto es eliminado rápidamente por los- riñones. Se cree que éste mecanismo protege al cuerpo- contra niveles altos de potasio.

Niveles superiores a 7.5 miliequivalentes -- por litro, causan perturbaciones serias e irritabili- dad muscular, respiración y función del miocardio (to- xicidad cardíaca). Niveles de 10 miliequivalentes por- litro, pueden ser mortales, aunque se han recuperado -

pacientes con niveles mas altos.

Alimentos con alto contenido de Potasio: café, cocoa, instantánea, hojuelas de salvado, galletas, pan de trigo entero y cereales para el desayuno, leche en polvo o leche entera, la mayor parte de los pescados y mariscos, la mayor parte de las carnes con contenido moderadamente alto, legumbres, nueces, sorgo, melaza, vegetales especialmente los de hojas verdes, brocoli, coliflor, zanahoria, betabeles y papas.

ALTERACIONES

Encontramos hipopotasemia en diarrea prolongada debido a la pérdida excesiva de potasio con las heces fecales; también por vómitos prolongados. Bajos niveles de potasio causan cambios excitatorios en la irritabilidad muscular y cambios electrocardiográficos característicos.

Los niveles normales de potasio en plasma caen generalmente entre 3.8 a 5.0 miliequivalentes por litro. La concentración de potasio de cada persona es constante, y casi todos los adultos normales --

presentan valores de potasio plasmático entre 4.0 y 4.7 miliequivalentes por litro. Estudios realizados han demostrado que el potasio del plasma tiende a disminuir de 0.1 a 0.2 miliequivalentes por día, durante el desarrollo de la deficiencia de potasio; por lo tanto los valores de 3.5 miliequivalentes por litro suelen asociarse a deficiencias de potasio y no a la normalidad.

CLORO

El cloro es de gran importancia clínica y analítica, además de ser el primer electrólito que se pudo determinar.

El ion cloro desempeña un papel esencial en la corrección de la alcalosis hipocalémica y en la regulación renal adecuada del equilibrio de los hidrogeniones y del potasio.

Se encuentran valores normales de cloro en plasma de 95.0 a 103.0 miliequivalentes por litro.

Los iones de cloruro ingeridos con alimentos

son absorbidos casi completamente por el tracto intestinal y se separan de la sangre por filtración glomerular, que son resorbidos de éste por los túbulos renales.

El cloruro puede perderse en cierta medida, por sudor excesivo durante las épocas de calor, sin embargo éstas situaciones son controladas por la hormona aldosterona.

ALTERACIONES

Se observan niveles bajos de cloruro en suero en: nefritis con pérdida de sal, en la enfermedad de Addison y en acidosis metabólica. Encontramos pérdidas por perspiraciones insensibles y sudor; si el aporte de sal no es adecuado, la concentración de cloruro de sodio puede bajar con síntomas parecidos a la insuficiencia suprarrenal. En toxemia del embarazo o uremia, habrá pérdida de cloruro especialmente y en menor grado del ion hidrógeno y del sodio.

Se observan valores altos de cloruro en sue-

ro en: deshidratación y en condiciones que causan disminución del flujo de sangre renal, como en fallo cardíaco.

CALCIO

Los iones calcio son esenciales para la conservación de la estructura del esqueleto del cuerpo, para la activación de diversas enzimas, para la coagulación de la sangre, contracción muscular y para la transmisión de los impulsos nerviosos; también disminuyen la permeabilidad de las membranas celulares y de los capilares, y deprimen la excitabilidad neuromuscular.

Intervienen muchos en la absorción del calcio a nivel del intestino delgado. Entre los factores que promueven la absorción intestinal del calcio tenemos: una concentración elevada de calcio, un pH bajo, la vitamina D que es esencial y la paratormona (dependiente de la vitamina D).

Dificultan la absorción de calcio: una concentración en la dieta (Ca:P) superior a 2:1 y el ácido fítico de los granos de cereales; diversas sustancias por ejemplo: hierro, plomo, manganeso, que forman fosfatos insolubles.

Con la ingesta de un gramo de calcio por día se absorbe aproximadamente el 15 por ciento. Durante la infancia, embarazo y lactancia las necesidades dietéticas (0.8 gramos por día) deben ser aumentadas en un 25 a 75 por ciento, para mantener un balance cálcico adecuado, éste es esencial para las necesidades metabólicas, especialmente entre las fases de crecimiento y desarrollo del hueso.

Alimentos con alto contenido de calcio.- La leche y sus derivados son las principales fuentes de calcio de la dieta.

ALTERACIONES

Las alteraciones pueden ser causadas por diferentes factores y se clasifican en : enfermedades --

óseas generalizadas, disfunción endocrina y la inges--
ta por la dieta o la absorción del calcio, así como de
la vitamina D.

Entre las enfermedades óseas podemos nombrar
la osteoporosis, que se refiere a la deficiencia de te--
jido óseo; la osteomalasia, cuando la masa ósea puede--
estar normal, aumentada o disminuida, pero la propor--
ción de tejido óseo no calcificado es mucho mayor. Da--
do que una gran proporción del tejido osteoide no está
calcificado, los huesos son blandos y se producen de--
formidades esqueléticas, con dolores óseos como rasgo
clínico más sobresaliente. La osteítis deformante o en--
fermedad de Paget, es una enfermedad que se caracteri--
za por destrucción del hueso.

Trastornos del metabolismo del calcio.- Entre éstos ci--
taremos los siguientes: La hipercalcemia que se presen--
ta en hiperparatiroidismo, intoxicación por vitamina D
neoplasias y enfermedad de Addison; la hipocalcemia se
presenta en hipoparatiroidismo, raquitismo, osteomala--
sia e insuficiencia renal.

MAGNESIO

Entre los cationes intracelulares, el magnesio es el segundo en cantidad, sólo precedido por potasio; a diferencia de el calcio, que es absorbido en el intestino superior con la ayuda de la vitamina D, el magnesio no requiere de ésta vitamina, ni de ningún otro factor similar para su absorción.

Los iones de magnesio sirven como activadores en varios sistemas enzimáticos importantes que afectan al metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas.

Los niveles aumentados de magnesio en suero se observan en :deshidratación, acidosis diabética seria y en la enfermedad de Addison.

La concentración normal de magnesio en suero es de 1.5 a 2.5 miliequivalentes por litro.

ALTERACIONES

Se sabe que hay un déficit de magnesio en --

los estados de mala absorción grave, también se ha descrito una tetania de carencia de magnesio, que se caracteriza por valores bajos de magnesio en suero.

Se han hallado niveles disminuidos de magnesio en suero en pancreatitis aguda, alcoholismo crónico y delirium tremens, glomerulonefritis crónica, aldosteronismo y pérdida excesiva de magnesio en orina. Se mencionó con anterioridad una tetania de carencia de magnesio que es probablemente la aplicación más importante de las determinaciones de magnesio en suero.

Colorimetría.

Desde que el color ha sido reconocido y aceptado como una característica de ciertos materiales, bajo determinadas condiciones, se le ha utilizado como un medio de identificación. Las pruebas de éste tipo están limitadas tanto en precisión como en alcance, ya que se basan en el poder del ojo humano como detector de energía radiante; y por lo tanto depende de la percepción - subjetiva del color que se origina en el cerebro humano. El ojo humano tiene demasiadas desventajas, como son: - una región espectral limitada, poca exactitud para distinguir las intensidades, también un alto grado de fatiga y lentitud en la respuesta influyen en los resultados de las mediciones.

Actualmente la detección visual está limitada a relativamente pocas aplicaciones, en donde la exactitud no es crítica.

Las técnicas fotométricas están basadas en la capacidad que tienen las sustancias de interactuar con frecuencias de radiación características. Ya que cada -

especie aislada de ión, átomo o molécula, exhibirá un conjunto de niveles de energía definidos; absorberá sólo las frecuencias electromagnéticas que corresponden a la excitación de un nivel a otro.

El comparador manufacturado por Helige. Icc. es uno de los fotómetros visuales que utiliza varios conjuntos de modelos de filtros de vidrio; cada conjunto está designado a un análisis en particular y tiene varios filtros con el mismo patrón de absorción, pero con una absorbancia variable. Para determinar la concentración de una sustancia desconocida, se inserta el disco apropiado y sus filtros, se compara visualmente con la muestra, ambas deben estar iluminadas por la misma fuente. Los filtros se calibran en términos de calibración para la longitud de trayectoria de la célula de muestra con que está provisto el instrumento; y cuando se encuentra la mejor igualación con la desconocida, se determina inmediatamente la concentración aproximada.

Otro tipo de colorímetro es el usado mediante el dispositivo de Duboscq, que nos permite determinar

concentraciones al variar la longitud de las trayectorias de absorción en una solución modelo y una desconocida.

En época reciente ha llegado a ser de uso común referirse a instrumentos que usan filtros para aislar parte del espectro como fotómetros, y referirse a instrumentos que usan rejillas o prismas como espectrofotómetros.

Un espectrofotómetro se produce con la incorporación de un monocromador como dispositivo para aislar la frecuencia de longitud de onda en un fotómetro. En contraste con un conjunto de filtros, el monocromador permite una variación continua en la selección de longitudes de onda sobre una porción del espectro, y proporciona un haz cuya amplitud de banda es con frecuencia ajustable y puede ser tan angosta que mida un Armstrong.

CARACTERISTICAS DE LOS DISTINTOS INSTRUMENTOS ESPECTROFOTOMETRICOS.

REGION	LIMITES mμ	ESPECIES ABSORBENTES O EMISORAS	APARATO	EMPLEO EN MEDICIONES CLINICAS USUALES
Rayos γ	0,1	Transformaciones de energía nuclear (isótopos radiactivos).	Detector de centelleo	Isótopos emisores de rayos.
Rayos X	0,1-10	Electrones de la concha interna.	Espectrómetro de rayos X	Actualmente limitado.
UV en vacío	10-200	Ionización de átomos y moléculas.	Espectrofotómetro de UV.	Ninguno.
UV	200-400	Desviaciones de la energía electrónica de la valencia	Espectrofotómetro de UV	UV de sustancias abs. por ejes: DPMH, barbitúricos.
Visible	400-700	Desviaciones de la energía electrónica de la valencia.	Espectrofotómetro visible Fotómetro de llama. Espectrofotómetro de Abs. Atómica.	En casi toda la química húmeda. Na y K En la mayor parte de los demás elementos metálicos.
Infrarrojos (IR)	700-25000	Vibraciones moleculares de estiramiento y flexión	Espectrofotómetro de IR	Toxicología

ESPECTROFOTOMETRIA

Actualmente en la Química Clínica uno de los métodos instrumentales más usado para las determinaciones de laboratorio clínico, es la Espectrofotometría. La mayoría de los análisis que se efectúan actualmente en laboratorios de química clínica se basan en hacer mediciones de la cantidad de luz absorbida por cada una de las sustancias objeto de medición; la mayor parte de las mediciones se hacen en la región visible del espectro, algunas en la región ultravioleta y aún menos en la región infrarroja, donde la región visible está por arriba de los 380 nm., la región ultravioleta por debajo de los 380 nm. y la infrarroja sobre los 700 nm. Así las determinaciones clínicas se efectúan normalmente en el rango espectral de 220 nm - 800 nm.

La espectrofotometría se basa en las propiedades de los átomos y moléculas para absorber o emitir la energía electromagnética en una de las muchas áreas del espectro electromagnético.

Para comprender y para el empleo inteligente de la metodología de la absorción espectrofotométrica es necesario conocer la Ley de Beer.

LEY DE BEER

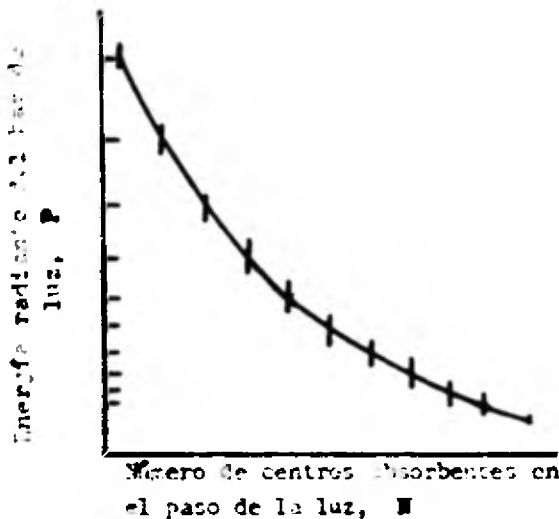
La combinación de las leyes de Lambert-Bouguer-Bunsen-Roscole-Beer, se conoce por conveniencia como Ley de Beer, sin embargo no hay que olvidar que las personas antes mencionadas contribuyeron a ella.

La Ley de Beer, enuncia que la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida, e inversamente proporcional al logaritmo de la luz transmitida.

Ecuación de la Ley de Beer.

La consideración de los aspectos cuantitativos de la absorción de la radiación requiere usar el término energía radiante P , que es la energía desprendida que incide sobre un área unidad en la unidad de tiempo. La absorción de la radiación implica reducción en la energía de un haz.

Considerar un haz de radiación monocromática que atraviesa una disolución en la que existe una población de N átomos o moléculas absorbentes. Si colocamos un detector de radiación a corta distancia del punto de entrada, se encontrará que la absorción por los átomos o moléculas que intervienen disminuye la energía del haz en una cantidad ΔP . Moviendo el detector a una distancia mayor resultará una nueva disminución del haz, debido al mayor número de moléculas absorbentes en el paso. La medida de la energía a intervalos sucesivos indicaría nuevas disminuciones como muestra la siguiente gráfica.



Gráfica # 1

Gráfica que muestra la disminución de la energía radiante de la luz a través de una disolución.

En ésta gráfica la energía es inicialmente - grande, pero decrece rápidamente cuando crece el paso de la luz (y por lo tanto, el número de absorbentes). Puesto que la energía radiante en cualquier punto es - menor que en cualquier punto precedente, es aparente - que la cantidad de absorción ΔP que tiene lugar en -- cualquier intervalo escogido depende no sólo del número de especies absorbentes N encontradas por el haz, - sino también de la energía de la radiación incidente. Esto puede ser expresado como

$$\Delta P = - k P \Delta N \quad (1)$$

en donde k es una constante de proporcionalidad. El -- signo menos es introducido a causa de una disminución que tiene lugar en la energía radiante. Si hacemos infinitamente pequeño el intervalo entre las medidas, en tonces tenemos:

$$\frac{dP}{P} = - k dN$$

La integración dará una medida de la absorción total -

en términos del número de cuerpos absorbentes. Si representamos por P_0 a la energía radiante del haz incidente, entonces $P = P_0$ cuando $N = 0$ y

$$\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = -k \int_0^N dN \quad (2)$$

$$\ln \frac{P}{P_0} = -kN$$

El número de centros absorbentes está claramente relacionado con la concentración molar c por medio del volumen en el cual están contenidos y el número de Avogadro

$$N = c \times 6 \times 10^{23} \times b \times s / 1000$$

en donde b es el espesor del paso en centímetros y s es su sección en centímetros cuadrados. La sustitución de esto en la ecuación 2 y la conversión a logaritmos de Brigg nos da:

$$\log \frac{P_0}{P} = \frac{k}{2,303} \times 6 \times 10^{23} \times s \times b \times c / 1000$$

$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc = A$$

La ecuación 3 es una ley fundamental que gobierna la absorción de todos los tipos de radiación electromagnética, y es conocida comúnmente como Ley de Beer.

El término logarítmico del lado izquierdo de la ecuación es la absorbancia, y está representado por el símbolo A . La constante ϵ es llamada absorptividad molar cuando la concentración c es expresada en términos de moles de absorbente por litro.

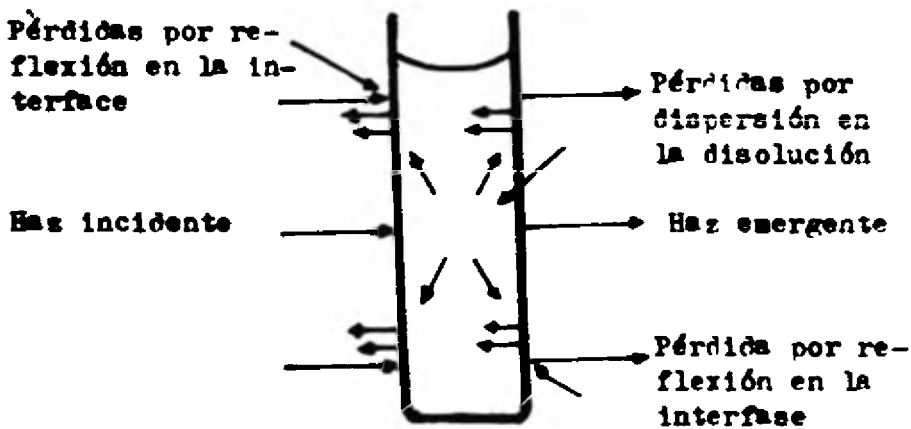


Fig. 1.- Procesos que afectan al haz de radiación cuando pasa a través de una disolución.

La Ley de Beer es una relación matemática - ideal y por ello tiene varias limitaciones en la práctica: pueden resultar desviaciones de la ley de Beer- por las siguientes condiciones:

- 1.- Absorción simultánea a longitudes de onda múltiples.
- 2.- Absorción de luz por otras especies presentes en la solución.
- 3.- Mediciones por intervalos de concentración extremos.
- 4.- Transmisión de luz por otros mecanismos.

En rigor la absorptividad es diferente para cada longitud de onda, a menos que la absorptividad sea constante por el intervalo de longitudes de onda usadas, no se seguirá la ley de Beer.

Si dos o más especies químicas absorben la longitud de onda de la luz que se usa y cada una de ellas tiene distinta absorptividad que las otras, no será seguida la ley de Beer. También ocurren desviaciones de la ley de Beer cuando se hacen mediciones -

en un intervalo de concentración muy ancho. Los intervalos de concentración que guardan relación lineal con la absorbancia varían según la sustancia. Finalmente si se mide la absorción de una sustancia fluorescente, no será seguida la ley de Beer.

En resumen, sólo será seguida la ley de Beer si la radiación incidente en la sustancia que interesa es monocromática, si la absorción por el disolvente es insignificante comparada con la absorbancia del soluto, si la concentración está entre ciertos límites y si no ocurre reacción química entre la molécula que interesa y otra molécula de soluto o de disolvente.

En relación con la colorimetría y con la ley de Beer se usan diversos términos técnicos como: Luz incidente.- Significa el rayo de luz que cae sobre un objeto y que puede ser parcialmente reflejada. La luz que penetra a través del cuerpo a su vez puede ser absorbida y entonces se designa como luz absorbida y el resto de luz pasa a través del cuerpo por -

lo que se designa como luz transmitida.

Para la mayoría de los casos la cantidad de luz reflejada se puede considerar como nula.

Transmitancia.- Es la relación que existe entre la -- cantidad de luz transmitida y la cantidad de luz inci- dente.

Cuanto más claro sea un cuerpo, mayor es su transmitancia, y cuanto más opaco, menor es su transmitancia.

En colorimetría se emplea más frecuentemente el valor de la transmitancia expresado en por ciento, de tal manera que un cuerpo que no absorbe nada de luz tiene una transmitancia de 100%. Si es completamente opaco la transmitancia es cero por ciento.

Absorbancia.- Absorbancia, extinción o densidad óptica, éstos tres términos son sinónimos y representan la medida en que la luz incidente es absorbida al pasar a través del cuerpo.

Longitud óptica.- Es la longitud del trayecto recorrido por el rayo de luz a través del cuerpo absorbente. La longitud óptica se mide comúnmente en centímetros.

Concentración.- Es el contenido de la sustancia ab--
sorbente que se halla en la solución o en el cuerpo a
través del cuál pasa el rayo luminoso. Esta concentración
se mide en gramos de sustancia absorbente por -
litro de solución.

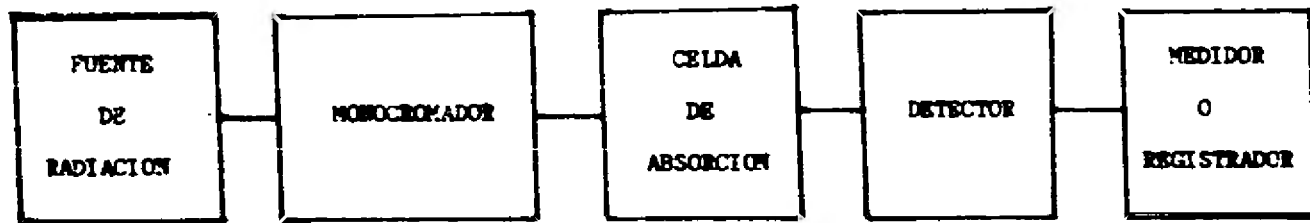
**Índice de absorbancia o coeficiente específico de ex-
tinción.**- Es la absorbancia que presenta una solución
cuando la concentración de la sustancia absorbente -
es igual a un gramo por litro (gr/lt), y además la --
longitud óptica es igual a un centímetro.

Índice molar de absorbancia.- Es la absorbancia que -
tiene una solución en que la concentración del soluto
es igual a un gramo mol por litro (1 gr mol/lt.).

Figura # 2

DIAGRAMA EN BLOQUES DE UN

APARATO DE ABSORCION



Componentes de un Espectrofotómetro.

Los componentes básicos de todos los espectrofotómetros requieren de una fuente de luz y una hendidura de entrada para que la luz que entra en el monocromador provenga de un punto común bien definido. El monocromador es un sistema de prismas o de rejillas por el cual la luz se separa en sus diversas longitudes de onda. Se usa la hendidura de salida para controlar el tamaño del haz o luz incidente que llega a la celda analítica o cubeta.

La celda a la que nos referimos es un recipiente de vidrio, cuarzo o plástico que contiene la solución cuya absorción de luz va a medirse. El detector es el módulo que mide la intensidad de la luz que atraviesa la cubeta (luz emergente). La salida del detector está relacionada con la concentración de la sustancia que interesa.

Fuente de Luz.

La función de la fuente de luz es proporcionar energía radiante en forma de luz visible o no visi-

ble que puede dirigirse para que atraviere el monocromador a fin de ser separada en longitud de onda discreta. Entonces se hace incidir la luz de la longitud de onda adecuada en la celda analítica que contiene la solución cuya absorción va a medirse.

La fuente de radiación ideal debe ser una fuente que proporcione una salida de radiación constante y uniforme, sobre una región espectral amplia.

La mayoría de las fuentes que se utilizan son intrínsecamente estables, sin embargo, sus salidas no serán más constantes que la energía que se les proporciona. En cuanto a la fuente con una energía constante, así como función de la longitud de onda, no puede obtenerse en realidad, debido a que es inherente a los métodos conocidos que generan radiación continua.

Un espectro continuo, contiene aproximadamente una representación igual de cada longitud de onda presente en una zona dada. El clásico ejemplo de una fuente de radiación continua es la lámpara de tungsteno, en éste caso se presentan longitudes de onda que van --

desde 400 a 1200 nm. con menor energía en las longitudes de onda largas que en las cortas.

Una fuente continua permite una selección de cualquier longitud de onda para el propósito que se de ee.

La lámpara de vapor de mercurio de baja presión emite un espectro discontinuo, o de línea que es muy útil para fines de calibración, pero no es muy --- práctico para fines de medición.

Las lámparas de hidrógeno y deuterio son --- fuentes de espectros continuos y discontinuos en la zo na ultravioleta como lo son también las lámparas de al ta presión con arco de mercurio y xenón; dichas fuentes son útiles en las determinaciones de la absorción ultravioleta y para producir fluorescencia.

Hendidura de Entrada.

La función de la hendidura de entrada es reducir al mínimo la dispersión de la luz y evitar que la luz dispersa, entre en el monocromador.

A menudo se utiliza una hendidura variable o

un diafragma iris para modificar la cantidad de luz que llega al elemento fotosensible. También puede ponerse en el circuito del galvanómetro una resistencia variable que permite modificar la sensibilidad del instrumento.

Monocromadores.

El monocromador es un dispositivo que permite aislar longitudes de onda específicas de la luz emitida por la fuente luminosa. Esto se consigue con el uso de prismas o de rejillas, o de unos y otras.

El prisma o la rejilla puede inclinarse o girarse en el haz de luz, para que sobre la cubeta y el detector, incida la longitud de onda adecuada. Otros espectrofotómetros como el de Coleman, consiguen que incida en la cubeta la longitud de onda apropiada moviendo la fuente luminosa.

En espectrofotometría visible se usan frecuentemente prismas de vidrio, pero para mediciones en la región ultravioleta se requieren prismas de cuarzo.

Filtros.

El dispositivo más sencillo es un filtro que generalmente está compuesto de un metal complejo disuelto o suspendido en vidrio.

El grado de monocromaticidad de un filtro o de un monocromador más sofisticado se representa mediante una anchura de banda media, esto se define como la amplitud de la longitud de onda transmitida a la mitad de la transmisión de la punta del filtro.

Un ejemplo de filtro de paso de banda estrecha es el filtro de interferencia que se compone de un emparejado (por así decirlo) de dos piezas medio plateadas de vidrio, con un material dieléctrico (que es un material aislante que no permite el paso de corriente eléctrica), de un grosor cuidadosamente controlado entre ambas capas plateadas. El grosor de la capa dieléctrica determina la longitud de onda de la energía que pasará a través de ella. Los filtros de interferencia son baratos por unidad, pero se necesitan varios juegos para trabajar a diferentes longitudes de onda.

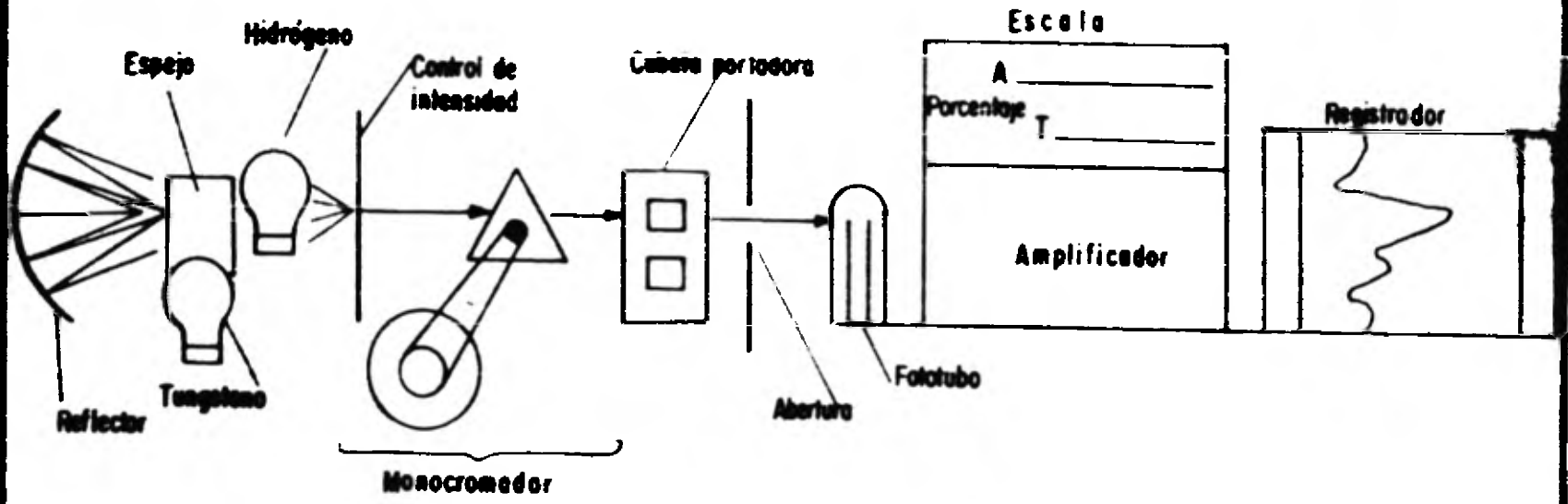
Celda Analítica o Cubeta.

La función de la cubeta es contener la solución en el instrumento, mientras se mide su absorción.

Las celdas o cubetas pueden ser de vidrio — blando o de borosilicato, de cuarzo o de plástico. Las primeras, las de vidrio blando se usan para soluciones que son acídicas y no atacan al vidrio; las celdas de borosilicato tienen más resistencia a los álcalis. Para mediciones que están por debajo de 320 nm. se utilizan solo celdas de cuarzo, o plástico que no absorban radiación ultravioleta.

FIGURA # 3

DISPOSICION BASICA DE LOS COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTOMETRO



ESPECTROPOTOMETRIA DE EMISION DE LLAMA.

La fotometría de llama es un método espectral que se basa en la excitación de electrones de un átomo por la energía calorífica de una llama; los electrones inestables en éste estado excitado, ceden su energía en exceso al ambiente, al pasar del estado de energía más alta (excitado) a un estado de energía más baja.

Si la energía se disipa como luz, la luz puede consistir de un nivel de energía y por ello puede poseer diferentes longitudes de onda; éstas longitudes de onda diferentes o líneas, son los espectros de los átomos, y son característicos de cada elemento.

Bajo condiciones constantes y reguladas, la intensidad de la luz de la longitud de onda característica producida por cada uno de los átomos es directamente proporcional al número de átomos que emiten energía, el cuál es a su vez directamente proporcional a la concentración de la substancia que interesa en la muestra; así es como la fotometría de llama se presta adecuadamente a mediciones directas de la concentración de al -

gunos metales.

Las aplicaciones más importantes de la fotometría de llama han sido el análisis de sodio y potasio, particularmente en líquidos y tejidos biológicos.

En un fotómetro de llama las muestras se disuelven primeramente. Para esto se han usado alcoholes, cetonas y ésteres de peso molecular más bajo, solos o mezclados con agua, para así, poder llevar la muestra a la llama.

El efecto principal de los disolventes en los espectros de llama, es aumentar el número de partículas disponibles para excitación sin un efecto adverso correspondiente en la temperatura de la llama.

Una vez que la muestra ha sido tratada con disolventes orgánicos se introduce en un quemador de diseño especial en la forma de un rocío fino, las gotas se forman mediante un dispositivo atomizador, utilizando aire regulado o una corriente de oxígeno, y las pequeñas gotas son arrastradas por el gas hacia la región del combustible.

Características de la Llama.

En la espectrofotometría de emisión de llama, la llama tiene como función:

- 1.- Convertir los constituyentes de la muestra líquida al estado de vapor.
- 2.- Descomponer éstos constituyentes en átomos o moléculas simples.
- 3.- Excitar electrónicamente una fracción de la especie atómica.

El objeto de la llama es transferir energía a los átomos no excitados, la variable más importante en la llama es la temperatura.

En la llama típica la temperatura máxima se produce en la región ligeramente arriba del cono interno, pero la distribución de temperaturas varía considerablemente según el combustible y el oxidante usados, y según su razón de concentración. La fracción de átomos excitados aumenta exponencialmente con la temperatura.

Para fotómetros de llama se utilizan varias combinaciones de gases y oxidantes.

Temperaturas Máximas de Llama de Varios Combustibles.

Combustible	Temperatura °C	
	en el aire	en el oxígeno
Gas	1700	2700
Propano	1925	2800
Butano	1900	2900
Hidrógeno	2100	2780
Acetileno	2200	3050
Cianógeno	—	4550

Todos éstos gases combustibles y los oxidantes que les acompañan dan buen servicio, y la única diferencia está en la temperatura de la llama y consiguientemente en la sensibilidad que procura cada combinación; por ésta razón es de suma importancia mantener constante la temperatura de la llama, pues de no ser así resultarán cambios en la sensibilidad.

El Atomizador.

El atomizador y la llama son los dos componentes más críticos en un fotómetro de llama. La función del atomizador es romper la solución en finas gotitas para que los átomos absorban energía térmica de la llama y se exciten.

En fotómetros de llama se usan comúnmente — dos tipos básicos de atomizadores, uno es el quemador de consumo total en donde se pasan los gases a alta velocidad sobre el extremo de un tubo capilar en suspensión en la solución, de modo que el líquido es aspirado por el capilar a la llama. La segunda clase de quemador implica la alimentación de la solución, por gravedad, a través de un capilar que la restringe, a un área donde fluye el gas a alta velocidad y en la cual se producen gotitas pequeñas que pasan a la llama; en este tipo de quemador las gotas grandes se recogen como residuo y no se obliga a toda la muestra pasar a la llama como en el tipo de quemador de capilar.

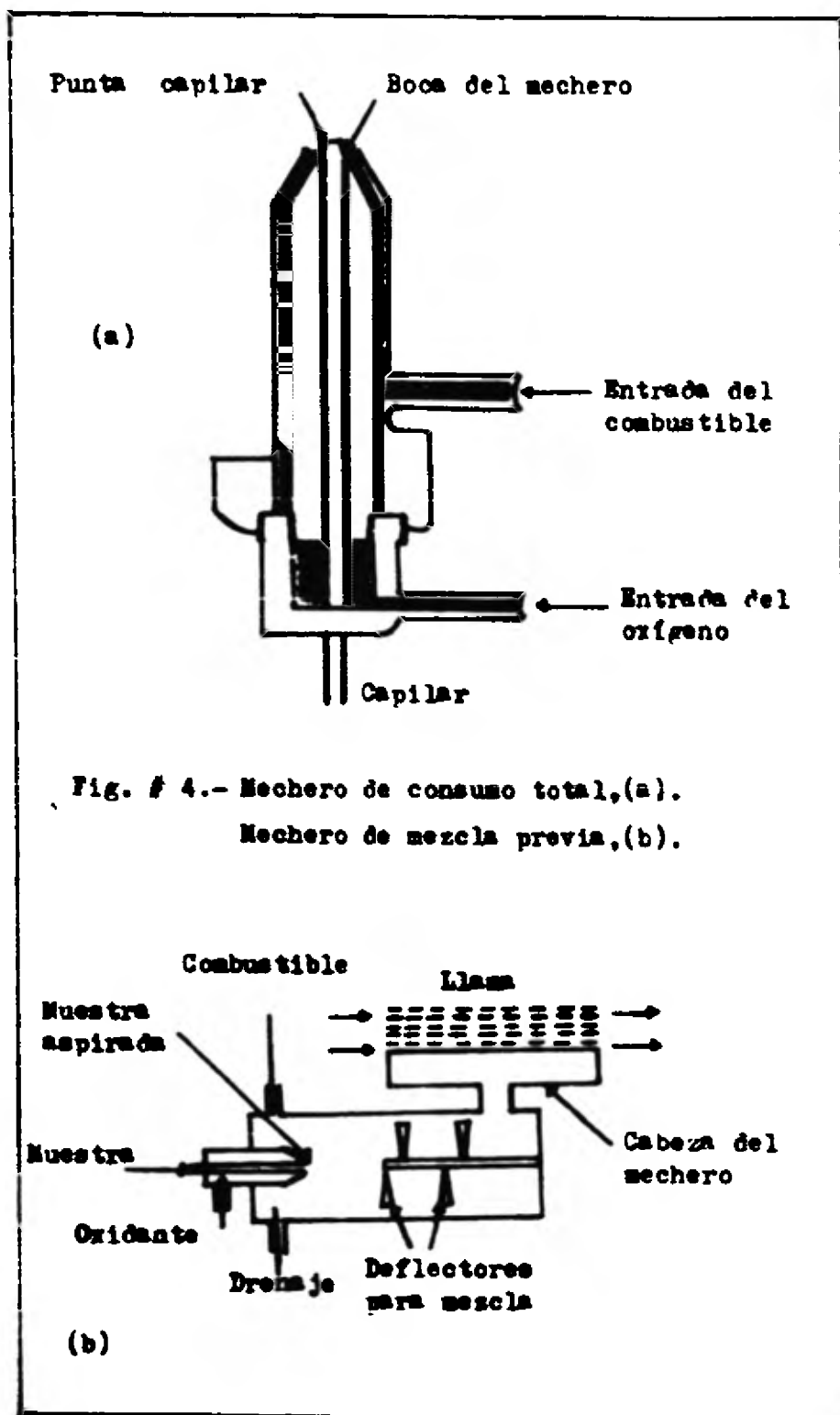


Fig. # 4.- Mechero de consumo total, (a).
 Mechero de mezcla previa, (b).

Monocromador.

La función de los monocromadores es aislar - la longitud de onda que interesa, de otras longitudes- que pudieran interferir, antes de pasar la luz al de-- tector. Cuando arden sustancias no iónicas, es emiti- da luz de longitud de onda variable. Esta emisión se - llama emisión continua y acompaña a la emisión de lí-- nea del elemento que va a medirse; por ésta causa, el- paso de banda más estrecho que pueda conseguirse elimi- nará tanto como sea posible la emisión continua de las sustancias extrañas, espurias, y permitirá aún el pa- so máximo de la emisión de línea al detector.

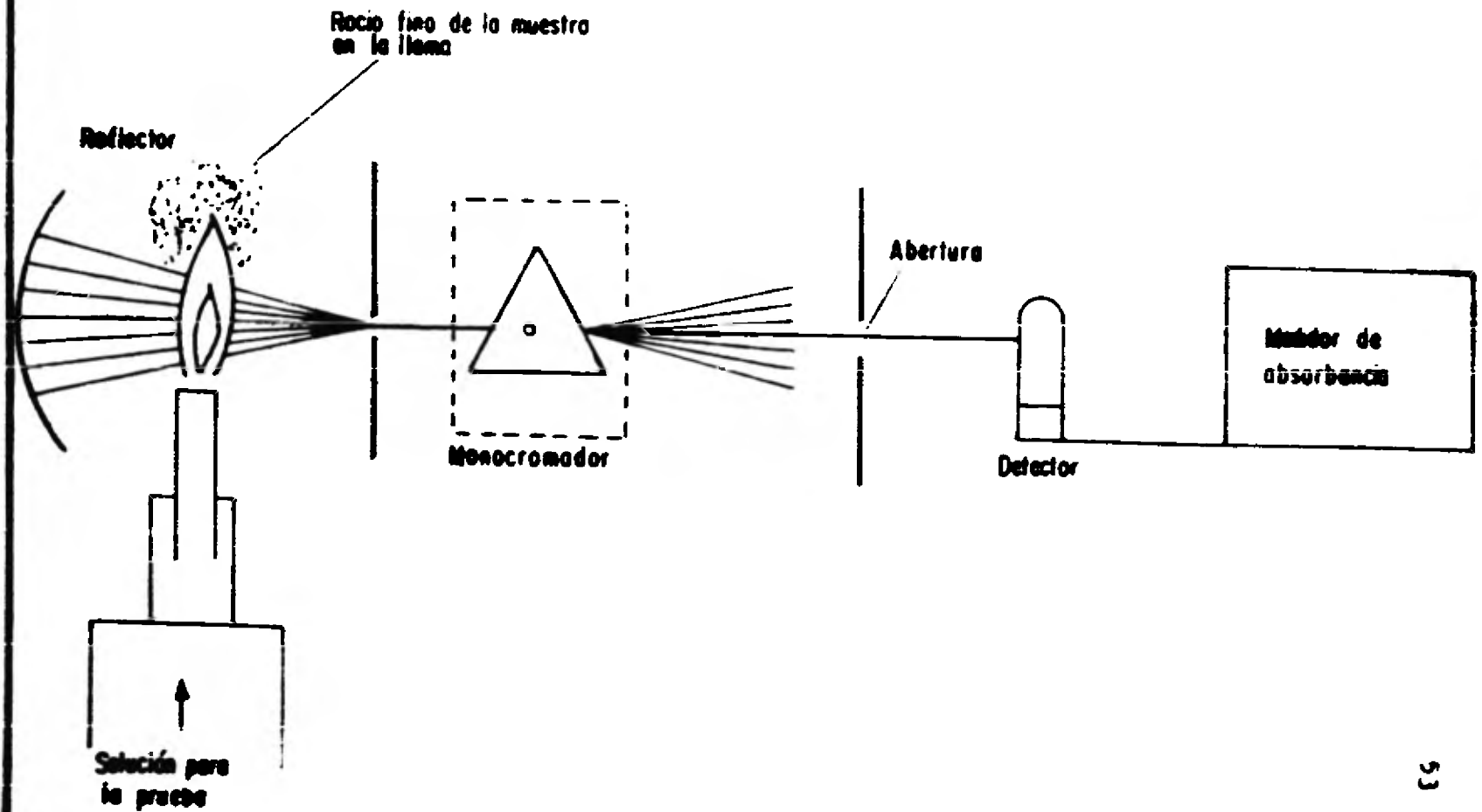
Detectores.

Los detectores usados en fotómetros de llama y en espectrofotometría funcionan por el mismo princi- pio y de igual manera. En el diseño de un fotómetro de llama han de incorporarse compensación o característi- cas de diseño para conseguir rápidamente equilibrio -- térmico. El cambio de temperatura afecta seriamente la

salida de los detectores de celda fotoeléctrica y es una fuente de error inherente en fotometría de llama. Los fotómetros de llama en que se usan detectores fotomultiplicadores tienen mejor sensibilidad y, por su diseño más perfecto, rara vez requieren largo tiempo para alcanzar equilibrio térmico, pero incluso éste tipo de fotómetro de llama requiere de ordinario aspiración de agua y estándares para establecer equilibrio térmico en la llama antes de efectuar las mediciones.

Figura #5

COMPONENTES DE UN FOTOMETRO DE LLAMA



ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

Aunque el fenómeno de absorción atómica, fué observado desde el descubrimiento (en el siglo XVIII)- de las líneas de Fraunhofer del espectro solar, no fué hasta 1955 cuando Allan Walsh, físico australiano, demostró que la absorción atómica podía utilizarse en el laboratorio de análisis químico para determinar cierto número de metales.

La espectrofotometría de absorción atómica - está muy relacionada con la fotometría de llama; pero - en lugar de medir la luz emitida por los átomos excitados, mide la luz absorbida por los átomos que no han - cambiado de estado. En otras palabras los métodos de emisión, la muestra se excita con el fin de medir la energía radiante que nos interesa, emitida cuando la - muestra regresa a su nivel más bajo de energía; en cambio en la espectrofotometría de absorción atómica no - se excita el estado fundamental mecánico cuántico, esto es, no ionizado. Todo lo anterior significa que el-

átomo está a un nivel de energía bajo en el cual puede absorber radiación a la anchura de paso muy estrecha - de 0.01 a 0.1 Å.

La energía de la radiación absorbida es igual a la que sería emitida por el elemento, si éste elemento se excitara.

La sensibilidad de la absorción atómica es aproximadamente de 100 tantos mayor que la luz de los métodos de emisión de llama.

La absorción de la luz por los átomos obedece a las mismas leyes que la absorción por las soluciones coloreadas, o sea, la absorbancia es proporcional a la concentración.

La muestra problema se nebuliza en una llama como en la fotometría por emisión y casi todos los iones pasan al estado atómico.

Como los átomos de los distintos elementos absorben luz de una longitud de onda específica, es posible medir la luz absorbida por un elemento en particular, en forma muy parecida como se mide la luz absor

bida por una solución coloreada.

Debido a que las líneas de absorción atómicas son estrechísimas (0.01 - 0.1 Angstroms), se requiere una fuente de luz que solo produzca aquellas longitudes de onda que el elemento problema vaya a absorber; esto se logra con lámparas de descarga en cátodo hueco, que contienen el elemento problema.

Componentes Esenciales de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

- 1.- Fuente de energía radiante.
- 2.- Instrumento para vaporizar muestras.
- 3.- Selector de longitud de onda.
- 4.- Equipo registrador y medidor de la intensidad (energía).

Fuentes de Energía Radiante.

Las fuentes de energía radiante emiten una radiación resonante del elemento que se está examinando por medio de la excitación de la muestra.

Entre éstas fuentes de emisión tenemos: los tubos Geissler, que son simples tubos con descarga a baja presión conteniendo vapor del elemento que se está excitando, éstos tubos casi no se usan en espectrofotometría de absorción atómica.

Las lámparas con descarga de vapor se encuentran disponibles en el comercio, incluyendo elementos tales como: sodio, potasio, talio, rubidio, cesio, mercurio, cadmio y zinc; los cuales pueden ser usados como fuentes de radiación.

Las radiaciones de cadmio y zinc pueden ser obtenidas más convenientemente a partir de lámparas de cátodo hueco, pero para los otros elementos mencionados las lámparas con descarga de vapor son probablemente las mejores fuentes de radiación.

El uso de las lámparas de descarga sin electrodos de alta frecuencia no es muy recomendado en espectrofotometría de absorción atómica, pero este importante método para producir espectros de línea fina pueden ser ventajosamente utilizados en estudios del

comportamiento de elementos tales como: mercurio, cadmio, talio, zinc y bismuto.

En general la producción total de radiación a partir de lámparas de sin electrodos de alta frecuencia, no es tan constante como las de las lámparas de cátodo hueco.

Las fuentes más útiles y más usadas para líneas de resonancia fina, son las lámparas de cátodo hueco. Estas lámparas pueden ser usadas para un amplio intervalo de elementos, están disponibles en el mercado pero son relativamente fáciles de hacer.

Las lámparas consisten de un cilindro hueco hecho de un material que contiene el elemento que se va a determinar, encerrado en una atmósfera de gas raro a presión baja, y es energizado por un potencial de cerca de 400 Volts con corriente de más de 100 mA. Como gas de llenado se usa de ordinario neón o argón; como ventana se usa cuarzo o un vidrio especial que permite transmisión de la longitud de onda adecuada. Se aplica corriente entre los dos electrodos en el inte---

rior de la lámpara de cátodo hueco y así es salpicado metal del cátodo a los gases, en el interior de la envoltura de vidrio. Cuando los átomos de metal entran en colisión con los gases neón o argón pierden energía y emiten su radiación característica.

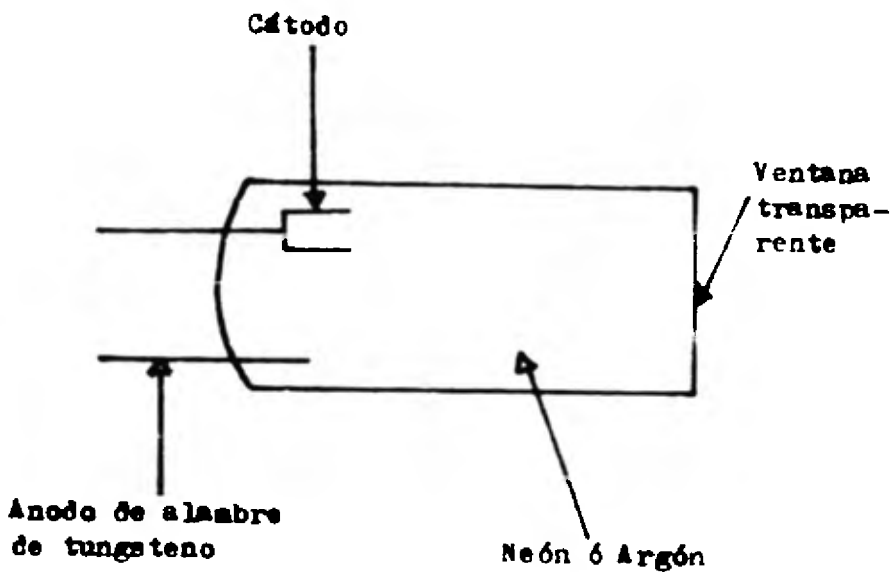


Fig. # 6.- Lámpara de Cátodo Hueco

Instrumentos para Vaporizar Muestras.

Convencionalmente se usan mecheros y atomizadores para producir vapor atómico de la solución de la muestra.

El atomizador más efectivo producirá el mayor número de pares vaporizados dentro de la flama -- por unidad de tiempo.

La temperatura de la flama no influirá en las características de la absorción significativamente tratando de que una temperatura suficientemente al -- esté disponible para producir un vapor atómico del elemento que está siendo determinado. Hay elementos -- que no producen cantidades significativas de vapor atómico en la flama, y por ésta razón, las mediciones -- en absorción atómica no han sido afortunadas en la de terminación de elementos tales como: Aluminio, Tita-- nio y Silicio.

El uso de la flama ori--cianógeno, para la -- cual se han pretendido temperaturas de cerca de 4600

grados Kelvin, o de la descarga del arco de flama, en donde las temperaturas excedieron los 1500 grados Kelvin, pueden incrementar la sensibilidad para algunos elementos y facilitar el vapor atómico de otros. Un factor que no debe pasarse por alto es que a estas temperaturas muy elevadas, la energía promedio de la flama puede ser suficiente para ionizar, o de otro modo, excitar una gran proporción de átomos presentes y esto puede obviamente agotar el número de átomos en el estado basal; se puede pretender una transacción entre la mayor concentración de vapor atómico y la proporción reducida de átomos en el estado basal.

Aunque un sistema atomizador-flama es la única fuente de vapor usada en el presente en aplicaciones prácticas de espectrofotometría de absorción atómica, otras fuentes pueden ser descubiertas en un futuro.

Selector de Longitud de Onda.

Un selector de longitud de onda, en su forma más simple, puede ser, un vidrio colorido o un fil

tro de gelatina, pero en muchos casos un buen monocromador ultravioleta es necesario para seleccionar la longitud de onda requerida. Un requerimiento básico para un selector de longitud de onda, es su capacidad para separar una línea (la línea de absorción), de todas las otras líneas emitidas por la fuente de energía radiante. Con fuentes de energía radiante, las cuales emiten la línea resonante del elemento en la región visible con gran intensidad y prácticamente sin otra radiación, por ejemplo una lámpara de vapor de sodio, la selección de la línea resonante puede hacerse con simples filtros de vidrio colorido.

En otros casos, en donde la línea resonante está en el visible, o próxima a la región ultravioleta filtros de interferencia pueden usarse como selectores sin suministrar líneas. Los filtros de interferencia no son apropiados, si la fuente de energía radiante emite señales de fondo porque éstas pueden ser transmitidas sobre la totalidad de la banda-amplitud del filtro.

La radiación de fondo no es absorbida en la flama y puede, por lo tanto, reducir la medición de la absorción y producir gráficas de calibración, curvas.

El más común y más versátil sistema para seleccionar una longitud de onda, es un monocromador capaz de variar la longitud de onda seleccionada.

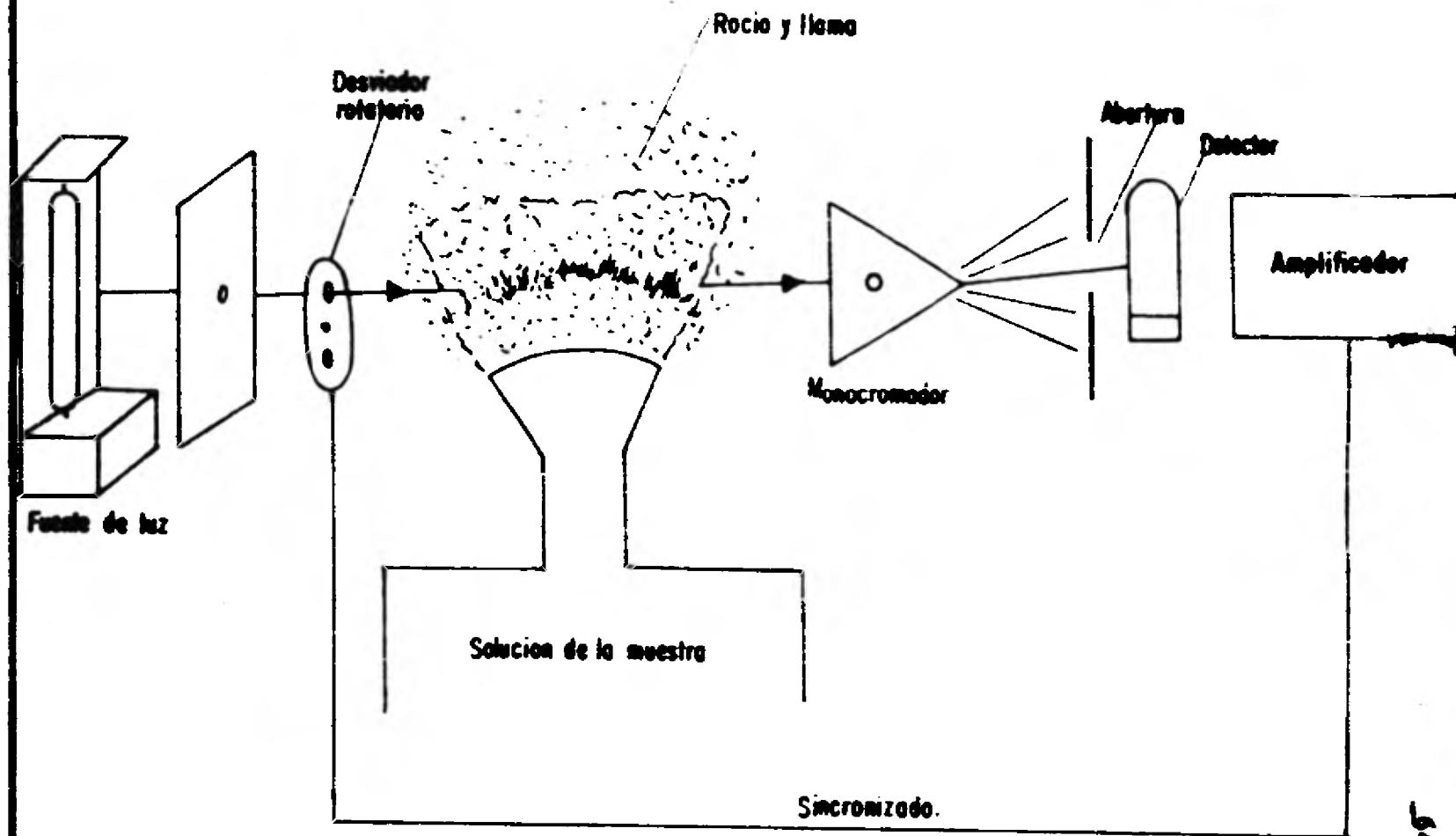
Equipo Registrador y Medidor de la Intensidad.

Para medir la intensidad de la radiación se emplean métodos estándares, como por ejemplo una simple fotocelda y un galvanómetro para medir la intensidad, pero en muchos otros casos, detectores fotomultiplicadores, son más útiles.

Varios métodos son utilizados para medir la producción total de corriente del fotomultiplicador, un simple galvanómetro puede ser usado previendo que corrientes muy bajas no sean medidas, y los resultados finales se indican sobre una carta registradora.

Figura # 7

ILUSTRACION DIAGRAMATICA DE UN ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION ATOMICA



CAPITULO III

Técnicas

TOMA Y MANEJO DE MUESTRA.

La preservación de la integridad química de las muestras desde el momento en que se recogen hasta el momento en que se analizan es de máxima importancia para que los resultados sean representativos.

Se pueden obtener las muestras sanguíneas - de tres sitios: arterias, capilares y venas.

La sangre venosa es la que se emplea generalmente para la determinación habitual de los electrolitos.

Para la toma de la muestra hay muchos tipos adecuados de jeringas, tubos en vacío y tubos capilares.

Postura del sujeto: éste reposará acostado - por lo menos durante 15 minutos antes de la extracción de sangre. Los cambios de la posición vertical a la horizontal y viceversa producen oscilaciones de los líquidos corporales.

Existe con frecuencia un error de concepto, que una estasis venosa durante 30 o 60 segundos trans

torne las determinaciones de los electrolitos, la simple estasis no altera la composición electrolítica de la sangre, pero sí lo hace el ejercicio muscular. Por lo tanto debe condenarse la frecuente orden de apretar el puño, porque causa alteraciones del pH y desplazamientos del agua y electrolitos entre los espacios intra y extracelulares. El torniquete venoso tiene que ocluir solamente las venas superficiales, no las profundas ni las arterias. La compresión venosa superficial ayuda a identificar las venas y la extracción rápida de sangre. No se recomienda quitar el torniquete inmediatamente después de penetrar en la vena, porque al soltarse puede haber una afluencia no deseada de metabolitos a partir de los lechos capilares estáticos; además el flujo hemático disminuirá cuando se suelte el torniquete.

En la mayoría de los laboratorios clínicos se utiliza el suero para las determinaciones de los electrolitos, aunque es preferible el plasma, porque los niveles de sodio y de potasio son constantes en él.

Punción.

Material y Equipo.

- 1.- Agujas número 20 y/o 21 de bisel regular o corto.
- 2.- Jeringas de vidrio o desechables de 10 o 20 ml.
- 3.- Tubo de hule látex de 5 mm. de diámetro para li - gar.
- 4.- torundas de algodón.
- 5.- Alcohol etílico.

También se puede usar el sistema Vacutainer, que nos permite obtener muestras directas, economía y eficacia.

Antes de hacer la punción es conveniente re - visar que el material esté en perfecto estado.

Se hace una revisión de los sitios donde habitualmente se observan con facilidad venas superficiales sobre planos resistentes y no muy sensibles: - pliegue del codo mitad externa, pliegue del codo mitad interna. Se limpia con alcohol la piel de la zona que se va a puncionar, se restira suavemente la piel de las regiones vecinas al sitio de la punción para -

fijar la vena y se procede a puncionar.

Obtención del suero.

Después de la toma de la muestra, lo ideal sería hacer todas las determinaciones en la primera hora posterior a la punción. Siempre que no sea factible esto, conviene preparar la muestra hasta un punto en que se pueda almacenar sin que se alteren los elementos que se van a determinar.

El suero se obtiene de la siguiente forma:- se deja coagular la sangre a la temperatura ambiente, generalmente de 20 a 30 minutos; cuando se haya hecho el coagulo desprenderlo suavemente por arriba con una barrita fina de cristal o un aplicador de madera. Centrifugar la sangre durante 10 min. a una fuerza centrífuga relativa de 850 a 1000 rpm.; evitar el exceso de centrifugación por encima de 1500 rpm durante periodos superiores a 15 min. Se etiqueta la muestra y se guarda en el refrigerador a 4°C o 5°C hasta analizarla o bien congelar a -20°C si se va a tardar más de 4 hrs. en realizar las determinaciones. El suero -

debe estar libre de hemolisis ya que interviene en ciertas determinaciones, bien por la suelta de contenido eritrocítico (por ejemplo potasio), o a través de cambios de color.

DETERMINACION DE SODIO Y POTASIO POR FOTOMETRIA
DE LLAMA

La firma Instrumentation Laboratories ha fabricado un fotómetro de estado sólido, con lectura directa de la llama, para análisis de sodio y potasio, - el cual se utiliza actualmente en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos; éste fotómetro lleva también un estándar interno de litio. En el fotómetro de llama IL se toma el cociente de las respuestas de los canales de litio y sodio y de litio y potasio, se amplifica y con éste cociente se alimenta un servomotor, el cual produce una lectura digital directa que aparece en el frente del instrumento. El litio actúa además como un amortiguador de radiación. Si se mide potasio por ejemplo, la señal de potasio depende de manera crítica de la cantidad de sodio presente, a menos que esté presente en alta concentración otro catión - que se excite fácilmente como litio. En ausencia de litio en alta concentración, será transferida energía de

un átomo de sodio excitado a un átomo de potasio, Esto produciría diferente porcentaje de átomos de potasio excitados, conforme a la concentración de sodio, y por lo tanto resultarán errores analíticos. Un medio de compensar éste error es diluir las muestras con una concentración de litio excesivamente alta, de modo que se excite el mismo porcentaje de átomos de potasio, -- cualquiera que sea la concentración de sodio en la muestra. El uso de un estándar interno, a la vez amortiguador de radiación, la lectura directa de las concentraciones de sodio y potasio y la simple dilución del suero por docientos tantos hacen del fotómetro de llama IL un instrumento muy adecuado para uso en el laboratorio de Química Clínica.

Los mayores problemas que se presentan en el uso de fotómetros de llama son resultado de insuficiente control sobre la llama y el aspirador; pero pequeñas variaciones en la presión del gas cambian la velocidad de aspiración de la muestra y la temperatura de la llama; por eso se han hecho importantes esfuerzos -

en cuanto al diseño, para asegurar que la llama y las condiciones de aspiración sean constantes. El fotómetro IL lleva incorporado un estándar interno de litio; en éstos instrumentos se emplea una sólo llama y detectores múltiples para vigilar la propia llama. El cociente de las respuestas de la muestra y del estándar de referencia (litio) en los detectores es proporcional a la concentración de la muestra. Por consiguiente, cualquier cambio en las propiedades de la llama y en las condiciones del aspirador afectaría simultáneamente la señal en ambos detectores, el del estándar de referencia, litio y el de la muestra. Con el uso del cociente de las respuestas de los detectores, se reducen al mínimo los errores debidos a fluctuaciones de la llama o a cambios en la velocidad de aspiración de la muestra.

DETERMINACION DE CLORO

Técnica de Schales y Schales.

Principio.- Los iones cloruro se titulan con los iones-mercúricos. El exceso de éstos reacciona con el indicador S-difenil-carbazona y da una coloración violeta.

Reactivos:

Indicador S-difenil-carbazona. (solución a).

Nitrato mercúrico (solución b).

Solución de cloruro de sodio 10 meq/lt.

Substancias:

S-difenil-carbazona q.p.

Alcohol etílico al 99.5 %.

Cloruro de sodio q.p.

Nitrato mercúrico q.p.

Acido nítrico q.p.

Material biológico: 1 ml. de sangre.

TECNICA :

1.- A 0.2 ml. de suero añadir 1.8 ml. de agua destilada y cuatro gotas de reactivo difenil-carbazona diluido en alcohol etílico, sol. a.

2.- Titular con el reactivo hasta la aparición de una coloración violeta pálido permanente.

Cálculos:

Los mililitros de reactivo de nitrato mercurico, b, usa dos por factor igual a meq. de cloro por litro.

3.- Titulación: De la solución de nitrato mercurico. Por ner 2 ml. de la solución de cloruro de sodio que contie ne 10 meq/lt. en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. Agregar 0.06 ml. de la solución del indicador a.

Titular con la solución de nitrato mercurico, b, hasta color violeta pálido permanente.

Dividir entre 100 el número de mililitros de la solu--- ción de nitrato mercurico que se gastaron en la titula- ción y se obtendrá el factor.

Valores normales: De 98 meq/lt. a 109 meq/lt.

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL CALCIO.

Método: Ferro-Ham.

Valores normales: De 9 a 11 mg/100 ml. ó 4.5 a 5.5 —
mEq./lt.

Reactivos:

- 1) Acido clorofánico. q.p.
- 2) Alcohol isopropílico al 50%.
- 3) EDTA al 6%.
- 4) Moni-trol. (solución de calcio con 10 mg./100 ml.)

Material biológico: 2 ml. de suero sanguíneo.

TECNICA:

1.- En dos tubos de centrifuga de 15 ml. marcados como

Problema y Moni-trol colocar:

Tubo Problema 2 ml. de suero.

Tubo Moni-trol 2 ml. de Moni-trol.

Trabajar al mismo tiempo los dos tubos.

2.- Añadir 1.0 ml. de reactivo de ácido clorofánico y
mezclar.

- 3.- Dejar reposar durante 30 minutos.
- 4.- Centrifugar a 800 rpm. durante 10 minutos.
- 5.- Decantar el líquido sobrenadante y dejar drenar durante tres minutos sobre papel filtro, secar la boca - del tubo con papel filtro.
- 6.- Lavar el precipitado con 6 o 7 ml. de alcohol isopropílico al 50%.
- 7.- Centrifugar y eliminar el sobrenadante de la misma forma como se indica en el paso 5.
- 8.- Añadir al precipitado dos gotas de agua destilada y agitar hasta suspender el precipitado.
- 9.- Añadir 6 ml. de reactivo de EDTA, tapar el tubo y agitar por inversión hasta solubilizar el precipitado totalmente.
- 10.- Leer a una longitud de onda de 520 nm. o con filtro número 52, ajustando a cien por ciento de transmitancia con Blanco de agua destilada.
- 11.- Sacar la concentración del problema de acuerdo -- con la concentración del monitrol.

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE MAGNESIO.

Método del Amarillo de Titanio.

Principio.- Se trata un filtrado de suero en ácido tricloroacético con el colorante amarillo de titanio (ácido metil benzotiacida-1, 3-4, 4'-diazaminobenzol-2, 2'-disulfónico) en solución alcalina. La capa roja que se forma se cree es colorante absorbido en la superficie por partículas coloidales de hidróxido de magnesio, las cuales se mantienen en solución con ayuda de alcohol polivinílico. Este último reactivo aumenta también la sensibilidad del método con un factor de 2 aproximadamente.

Valores normales: La concentración de magnesio en suero es de 1.4 a 2.3 mEq/l. (1.7- 2.8 μ g/100 ml.)

Reactivos:

- 1) Acido tricloroacético al 5%.
- 2) Hidróxido sódico 5.0 Normal.
- 3) Alcohol polivinílico al 0.1%.
- 4) Amarillo de titanio (solución de trabajo).
- 5) Estándar de depósito (20 mEq/lit.)

TECNICA:

- 1.- Se introduce 1 ml. de suero problema en un tubo de ensayo de 15 por 150 mm. y se inyectan 5 ml. de ácido-tricloroacético al 5%.
- 2.- Se mezcla suavemente el contenido de cada uno de los tubos, se dejan éstos en reposo 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a 2000 rpm.
- 3.- Se transfieren 3 ml. de sobrenadante claro de cada tubo a cubetas Coleman o de otro tipo adecuado.
- 4.- Se prepara una serie de estándares introduciendo con pipeta 0.5 ml. de cada uno de los estándares de trabajo de magnesio en cubetas aparte, seguido por 2.5 ml. de ácido tricloroacético al 5%. Se prepara un testigo de reactivo, para lo cual en vez del estándar de magnesio se pone agua destilada.
- 5.- A todas las cubetas se agregan 2 ml. de la solución de trabajo del amarillo de titanio y 1 ml. de hidróxido de sodio 5.0 N. Se mezcla bien el contenido en cada cubeta y se leen después de 5 minutos, pero no más de 30 min. a una longitud de onda de 540 nm. con -

el testigo del reactivo ajustado a 100% de transmitancia ó a absorbancia cero.

DETERMINACION DE MAGNESIO POR ESPECTROFOTOMETRIA
DE ABSORCION ATOMICA

Principio.- Una lámpara de cátodo hueco forrado de magnesio, produce luz de longitud de onda característica- esta luz se pasa a través de la flama donde se proyecta, a presión, la muestra, los átomos de magnesio en estado basal la absorben.

La diferencia de la intensidad de la luz que atraviesa la flama antes y después de la introducción de la muestra, es proporcional a la concentración de magnesio en ella.

Apáratos:

Espectrofotómetro de absorción atómica Unicam SP90A.

Reactivos:

- 1) Óxido de magnesio q.n.
- 2) Ácido clorhídrico c.p.
- 3) Etilendiaminotetracético disódico q.n.
- 4) Solución de magnesio 100 mg. en un litro
- 5) Solución de magnesio 10 mg. en un litro.

- 6) Solución de etilendiaminotetracético disódico con
3.75 g. en 100 ml.
- 7) Solución de etilendiaminotetracético disódico con
0.78 g. en 100 ml.

Material biológico: 0.4 ml. de suero sanguíneo.

TECNICA:

1.- En un matraz volumétrico de 10 ml. se colocan 0.4 ml. de suero problema; se afora con solución de etilendiaminotetracético disódico con 0.78 g. en 100 ml. El suero queda diluido 1:25 en una solución de etilendiaminotetracético al 0.78 p. en 100 ml.

2.- Los problemas y la curva de calibración se leen en absorción atómica según las indicaciones siguientes:

Longitud de onda	285.2 milimicras
Abertura	0.08 mm.
Filtro	1
Cantidad de corriente	4 miliamperios de acetileno
Queador	
Altura del quemador	1.0 cm.

Presión del acetileno 0.7 kg. por cm.²

Aire 2.1 Kg. por cm.²

3.- Manipulación:

Se coloca el cero con solución estándar, se hacen las expansiones de escala necesarias para tener la sensibilidad para mediciones exactas.

Se lee en la curva de calibración.

Se lee el problema.

Las concentraciones se obtienen en miligramos de magnesio en 100 ml. de suero; si se requieran en miliequivalentes por litro, deben multiplicarse por 0.823.

Valores normales: de 1.8 a 3.6 mg. en 10 ml.

CAPITULO IV

Datos

DATOS

Los datos que a continuación se presentan -- son resultados de determinaciones efectuadas por los -- métodos Espectrofotométricos, citados en este trabajo -- los cuales se utilizan actualmente en Química Analítica, en la mayoría de los Laboratorios Clínicos.

Valores Normales

Sodio 132 - 142 meq./l.

Potasio 4.0 - 4.8 meq./l.

Cloro 95 - 103 meq./l.

Calcio 9.0 - 11 meq./l.

Magnesio 1.5 - 2.5 meq./l.

TABLA # 1

Muestra	Na meq/lt	K meq/lt	Cl meq/lt	Ca mg/100ml	Mg meq/lt
1	137	4.8	99	9.0	1.5
2	135	5.3	97	9.8	2.8
3	141	4.4	97	11.7	1.8
4	130	4.2	95	9.0	1.9
5	<u>120</u>	6.4	103	8.0	2.2
6	137	4.2	103	10.3	2.0
7	136	4.2	97	9.0	1.7
8	139	4.4	92	9.8	2.3
9	122	6.1	89	10.7	2.6
10	126	4.3	98	9.0	1.0
11	128	5.3	98	11.8	1.3
12	127	3.9	108	10.8	1.1
13	147	5.3	102	8.6	2.1
14	141	4.8	93	9.6	2.0
15	138	4.2	95	9.5	2.2

TABLA # 2

Muestra	Na meq/lt	K meq/lt	Cl meq/lt	Ca mg/100ml	Mg meq/lt
16	138	4.3	95	8.6	1.4
17	137	3.8	92	10.6	2.0
18	132	4.4	88	9.0	1.7
19	124	4.8	93	9.8	1.5
20	130	4.6	91	10.6	1.6
21	144	4.3	104	9.7	1.6
22	130	4.6	90	10.6	2.3
23	136	5.2	104	8.0	1.1
24	136	4.0	95	8.5	2.6
25	137	4.8	93	8.7	2.2
26	136	4.1	97	9.1	2.1
27	136	4.0	98	10.4	1.6
28	140	5.0	108	9.8	1.9
29	137	6.1	99	8.9	2.4
30	133	4.2	90	11.9	1.8

TABLA # 3

Muestra	Na meq/lt	K meq/lt	Cl meq/lt	Ca mg/100ml	Mg meq/lt
31	137	3.7	99	10.8	1.4
32	135	3.9	90	9.4	1.8
33	141	4.4	92	10.8	1.5
34	132	3.9	95	10.7	0.9
35	135	3.4	97	12.0	1.0
36	146	4.5	104	11.4	2.8
37	145	3.6	95	9.0	2.1
38	142	3.8	106	9.0	1.6
39	142	4.0	104	8.7	1.5
40	135	3.8	99	10.8	2.8
41	140	5.0	102	10.0	1.8
42	134	3.5	102	10.4	1.9
43	143	3.9	109	11.7	1.8
44	133	4.4	90	9.0	1.2
45	138	4.0	95	9.0	1.0

C A P I T U L O V**Conclusiones**

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta las consideraciones y contenido de éste trabajo, presentamos como parte de las conclusiones un diagrama en el cuál se reúnen las condiciones más importantes para llevar a cabo una determinación en Química Clínica, además de las ventajas — que representa el conocer los aparatos que se manejan en ésta área, sobre todo los resultados que se pueden obtener en determinaciones de iones metálicos utilizando los métodos espectrofotométricos adecuadamente.

En primer lugar es básico conocer los fundamentos teóricos y prácticos del Análisis Instrumental, lo que nos lleva a un manejo correcto de los aparatos en el laboratorio. Basandonos en lo anterior las determinaciones en Química Clínica se realizarán en óptimas condiciones, así mismo los resultados serán muestra — clara de la normalidad o alteraciones de cualquiera de los elementos, que se presentan en los sueros sanguíneos.

La manifestación más palpable que podemos tener de una correcta utilización de los instrumentos, es la calidad de la determinación, la vida prolongada del aparato y por supuesto la veracidad de los resultados.

A través de las investigaciones en el campo clínico, se ha observado que en los laboratorios donde existe mayor número de profesionales de esta rama, --- quienes se han reforzado con enseñanzas sobre métodos instrumentales, se han obtenido resultados óptimos en el control de calidad de las determinaciones, se han seleccionado mejores técnicas y métodos así como la experta operación de los instrumentos analíticos.

Concluyendo se observa que las determinaciones de iones como sodio, potasio, cloro, calcio y magnesio se realizan con mayor exactitud y rapidez, por los métodos y técnicas citados en este trabajo.

C A P I T U L O V I

Bibliografía

B I B L I O G R A F I A

- Barnard J.A., Chagen R. Métodos Modernos de Análisis Químico. Edición URMO, España. (1970).
- Basinski, D.H.: En Standard Methods of Clinical Chemistry S. Meites, dir. New York, Academic Press Inc. vol. 5.
- Bauman Robert P. Absorption Spectroscopy. John J. Sons, Inc. New York.
- Browning D.R. Espectroscopía. Toray - Masson, S.A. - Barcelona.
- Davison I, Henry J.B., Todd Stanford. Diagnostico Clínico para Laboratorio. Salvat Editores, México, - 1976.
- Dawson, J.B., y Heaton, F.W.: The Determination of Magnesium in Biological materials by Atomic Absorption Spectrophotometry, Biochem J. 80:99,106, 1961.

- Ewing Gale W., Instrumental Methods of Chemical Analysis Mc. Graw - Hill Book Company Inc. New York, Toronto. London.
- Ferro, P.V. y Ham, A..B.: Am. J. Clin. Path, 28 :208
1957, 28 : 689, 1957.
- Gow, T.H. Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis. Wiley - Inter Science a Division of John Wiley J. Sons Inc.
- Gutiérrez Contreras, Mario. Manual de Análisis Cuantitativo. COPAA, (1960).
- Horlick, Gary. Flame Emission, Atomic Absorption and Fluorescence Spectrometry. Anal.Chem. vol. 52. No. 5 April 1980, P. 290 R - 305 R.
- Laidlaw, W.G. Introduction to Quantum Concepts in Spectroscopy. Mc. Graw - Hill Book. Company, New York.

- Lothian G.P., M.A.P. Inst. P. Absorption Spectrophotometry. Hilger. Watts LTD .London.
- Mann, Charles K., Vickers, Thomas L. Gulick, Wilson M. Instrumental Analysis. Horper Z. Row, Publishers New York.
- Martínez, Fco. Benjamín. La Química Analítica. Lección Inaugural del Curso Académico, 1967.
- Manual of Clinical Chemistry Procedures, Miami Dade Reagents, 1965, pág. 56.
- Manual Coleman Instruments. Maxwell, M.H., and Klee-man, C.R.: Clinical Disorders of Fluidan Electrolyte Metabolism. New York, Blakiston Division, Mc. Graw - Hill Book Company, 1962.
- Pecock, Robert L., Shields, L. Donald, Métodos Modernos de Análisis Químico. México, Limusa, 1973.
- Perkin - Elmer Corp. Norwalk, Conn (1968). Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry.

- Pickering W.F. Química Analítica Moderna. Ed. Reverté S.A. (1976). Barcelona, México.
- Reynolds Charles A. Principles of Analytical Chemistry. Allyn and Bacon Inc. Boston. 1966.
- Reilley Charles M., Sawyer Donald T. Mc. Graw - Hill Book Company. Inc. New York. Toronto, London (1961).
- Schales, O. y Schales, S.S.: Simple and Accurate Method for Determination of Chloride in Biological Fluids. J. Biol. Chem., 140 : 879, 1941.
- Schales, O. Standard Methods of Clinical Chemistry, New York, M. Reiner Academic Press, 1953. vol. 1. pag. 37.
- Skoog, A. Douglas, West, Donald N. Fundamentos de Química Analítica. Ed. Reverté, Barcelona (1970).
- Skoog A. Douglas. West. M Donald. Principles of Instrumental Analysis . H.O.H. Rinehart and Winston — Inc. New York 1971.

- Slavin, Morris. 1901. Atomic Absorption Spectroscopy. New York. J. Willey, 1978.
- Snell, F.D. Colorimetric Methods of Analysis, vol.2.
- Strobel, Howard A. Chemical Instrumentation. Addison
- Wesley Publishing Company In. London.
- Thiers, R.E.: En Standard Methods of Clinical Chemistry. S. Meites, dir. New York, Academic Press, Inc.
vol. 5, (1965).
- Tiets, Norbert W. Química Clínica Moderna. Interamericana. S.A. de C.V. México, (1970).
- Vargu, Michael E. Atomic Absorption Newsletter.
- Walker, S. Straw, H. Spectroscopy Ultra - Violet, Visible, Infra - Red and Raman Spectroscopy. Science - Paperbacks Chapman and Hall L.T.D. vol. 2.
- Walter, J. Boyko, Kelher, Peter N. y Malloy, James
M. Emission Spectrometry. Analytical Chemistry. vol.

52 No. 5 April. (1980). P. 53 R - 68 R.

- Willard, H. Hobart, Furman, Howell N., Bricker, Clark E. Elements of Quantitative Analysis Teori and Practic. D. Van Nostrand Company, Inc. New Jersey.
- Willard, Hobart., Lynne, L. Merrit Jr., Dean, John A. Instrumental Methods of Analysis. D. Van. Nostrand - Company New York.
- Willard, H. Hobard., Merrit Lynne L. Jr. Dean John A. Instrumental Methods of Analysis. Litton Educational Publishing Inc. (1974).