

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

ESPECTROFOTOMETRIA, FLAMOMETRIA Y  
FLUOROMETRIA:  
SU APLICACION EN BIOQUIMICA CLINICA

TEMA DEL CURSO DE ANALISIS QUIMICO  
CLINICOS, CLAVE 036-Q-10

365

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JORGE PLA BLANCH

1976



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CLAS TESIS 1976  
ADQ M. T. - Am...  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC 350



QUINGA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EI

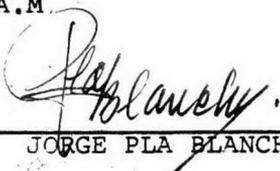
PRESIDENTE: RAMON GUEVARA ESTRADA  
VOCAL: GUADALUPE LETICIA CARRASCO RIVERA  
SECRETARIO: ESTHER GUTIERREZ HIDALGO  
1er.SUPLENTE: JOSEFA PIEDRAS ROSS  
2do.SUPLENTE: LUZ MA. HERNANDEZ BELTRAN

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 301 de la Facultad de Química

U.N.A.M

SUSTENTANTE:

  
JORGE PLA BLANCH

ASESOR DEL TEMA: RAMON GUEVARA ESTRADA, Q.F.B.



A mis padres con sincero agradecimiento  
porque con su actitud me han señalado un  
camino recto y fructífero.

A mi esposa por su constante amor y estímulo

A nuestro hijo con profundo amor

A todos aquellos que de una u otra  
manera me han brindado cariño y es  
tímulo en todo momento.

# I N D I C E

	Pág.
I N T R O D U C C I O N	1
I. ANTECEDENTES	3
II. VOCABULARIO	5
III. LEYES DE LA COLORIMETRIA	9
IV. COLORIMETROS OPTICOS	14
V. FOTOCOLORIMETROS	24
VI. ESPECTROFOTOMETROS	28
VII. FLAMOMETROS	74
VIII. FLUOROMETROS	98
IX. RESUMEN	115
X. CONCLUSIONES	
XI. BIBLIOGRAFIA	

## I N T R O D U C C I O N

Una gran cantidad de las mediciones efectuadas en el laboratorio de análisis clínicos son sencillas debido al empleo de instrumentos que pueden ser, desde aquellos relativamente sencillos hasta los más complejos.

A medida que continúan las investigaciones para llevar a cabo los diagnósticos y para detectar anomalías clínicas en forma más rápida y simple, se desarrollan nuevos y mejores instrumentos y la automatización se incrementa día con día. Sin embargo, esto es un arma de dos filos, puesto que si solamente se introduce el empleo de los instrumentos en el laboratorio y se utilizan mediante una "receta de cocina", sin tener un conocimiento básico de todo lo referente a ellos, el analista se convierte en un autómatas, además de que no puede obtener todos los beneficios que ofrecen estos dispositivos.

Es la finalidad de esta tesis presentar un panorama lo más completo posible, teniendo en cuenta las limitaciones que ofrece la falta de espacio, de los componentes, funcionamiento, manejo y cuidados de los instrumentos que pueden encontrarse en un laboratorio de análisis clínicos, o con los cuales puede enfrentarse una persona dedi-

cada al análisis en la bioquímica clínica.

Consideramos que la comprensión de dichos dispositivos es esencial no sólo para los jefes de laboratorio sino también para los analistas, puesto que es importante - saber no sólo el orden en que deben accionarse los controles de un instrumento determinado, sino también lo que sucede en el interior del mismo.

Con un entendimiento básico, sentido común y un poco de habilidad mecánica, alrededor del 90% de los problemas que surgen debido al empleo de instrumentos, puede ser resuelto.

## I. ANTECEDENTES

Citaremos las necesidades que surgieron durante el desarrollo de la bioquímica clínica y que originaron las técnicas e instrumentos que conocemos hoy en día:

- a). Comparación del cambio de color que se produce para que una reacción química llegue a un final, como ejemplo podemos citar la determinación de ácido clorhídrico libre en jugo gástrico por medio del procedimiento de Töpfer y la determinación de cloruros en plasma o suero mediante el método de Schales y Schales.
- b). Necesidad de comparar una sustancia colorida -- contra un patrón impreso que en este caso ejemplificaremos con el método de Talquist, para determinación de la concentración de hemoglobina en sangre.
- c). Observación de lo impreciso de la comparación, y desarrollo de patrones coloridos como barras de vidrio. En este inciso podemos mencionar el hemoglobínómetro de Sahli y el de Haden-Hausser.
- d). Nuevas técnicas de comparación con el colorímetro de Lovy-Bond.
- e). Aparición de los colorímetros ópticos de Duboscq.

- f). Preparación y mejoramiento de sistemas eléctricos en un principio, y posteriormente de tipo -- electrónico.
- g). Aplicación de estos sistemas en nefelometría, -- flamometría, fluorometría, etc.
- h). Aplicación de los instrumentos de medición en au toanalizadores, tanto del tipo de flujo continuo como de flujo discreto.
- i). Importancia del equipo, su selección adecuada en función de las necesidades concretas, tanto en - sistemas de control de calidad como en sistemas- utilizados en un laboratorio de bioquímica clínica.

## II. VOCABULARIO

<u>TERMINO</u>	<u>SIMBOLO</u>	<u>DEFINICION</u>	<u>SINONIMO</u>
Luz		Energía radiante en la escala espectral visible al ojo humano (380 a 780 nm.).	
Energía radiante		Energía transmitida como radiación electromagnética.	
Poder Radiante	P	Proporción a la cual se transmite la energía en un haz de energía radiante	Flujo Radiante (I).
Longitud de Onda		Distancia existente entre las crestas de una onda. Se expresa en nm. o Å en las escalas visible y ultravioleta y en micras en el infrarrojo.	
Número de Onda	$\sigma$	Número de ondas/unidad de longitud en un vacío; la unidad usual para expresarlo es cm <sup>-1</sup> .	$\bar{\nu}$
Frecuencia	f	Número de ciclos de energía radiante/unidad de tiempo.	

<u>TERMINO</u>	<u>SIMBOLO</u>	<u>DEFINICION</u>	<u>SINONIMO</u>
Ultravioleta	uv	Región del espectro comprendida entre 10 y 380 nm.	
Ultravioleta lejano		Región comprendida entre 10 y 200 nm.	
Ultravioleta cercano		Región comprendida entre 200 y 380 nm.	
Espectro		Arreglo ordenado de energía radiante de acuerdo a la longitud de onda.	
Nanómetro	nm.	Unidad de longitud igual a $10^{-9}$ m.	Milimicra (m $\mu$ ).
Micra	$\mu$	Unidad de longitud igual a $10^{-6}$ m.	
Ångstrom	Å.	Unidad de longitud igual a $10^{-10}$ m.	
Abсорbancia	A	$\log. (1/T) = -\log. T = 2 - \log. \% T$	Densidad Optica (D.O.) Extinción (E, $\epsilon$ ).
Absorbimetría		Método que involucra la determinación de la capacidad de absorción de energía radiante por un sistema.	Colorimetría.
Absortividad	a	Absorbancia/unidad de concentración y grosor, es decir absorbancia específica. $a = A/bc$	Absorción específica Coef. de Extinción (K, $\epsilon$ , k).  Extinción específica (K, $K_{SP}$ , k)

<u>TERMINO</u>	<u>SIMBOLO</u>	<u>DEFINICION</u>	<u>SINONIMO</u>
Absortividad Molar	$\epsilon$	Absortividad en unidades de litro/mol-cm. Frecuente <sup>mente</sup> se le representa como: $A_1^M$ cm.	Coefficiente de Extinción - Molar o - Molecular ( $K_m, \epsilon_{mol}, E, A_c$ ). Indice de Absorbancia Molar ( $a_M$ ).
Transmitancia	T	Proporción existente entre el poder radiante -- transmitido (P) por la muestra y el poder radiante incidente ( $P_0$ ) en la misma, midiéndose ambos en la misma posición espectral y con la misma anchura de banda espectral. $T = P/P_0$ .	Transmisión (T) Transmisividad. (T).
Porcentaje de Transmitancia	%T	Es la transmisión multiplicada por cien ( $\%T = 100 T$ ).	Porcentaje Transmisión ( $\%T, t$ ).
Fotómetro de Filtro		Instrumento que mide la transmisión de la luz, - en el cual la anchura de banda espectral es amplia y usualmente aislada por un filtro transparente.	
Fotómetro Fotoeléctrico		Instrumento que mide el poder radiante transformándolo en energía eléctrica mediante un elemento sensible como un fototubo o celda de capa barrera.	Colorímetro

<u>TERMINO</u>	<u>SIMBOLO</u>	<u>DEFINICION</u>	<u>SINONIMO</u>
Espectrofo- tómetro		Instrumento que mide el poder radiante en función de la longitud de onda. Fotómetro de filtro con un amplio número de filtros.	
Mitad de la Anchura del Paso de Banda.		Es la escala de longitudes de onda entre los dos puntos a los cuales la transmitancia es la mitad del pico de transmitancia de las varias longitudes de onda incluidas en la luz transmitida por un monocromador.	Paso de banda.
Longitud de Onda Nominal		Longitud de onda a la cual se encuentra el pico de transmitancia.	
Pico de Trans- mitancia		El máximo tanto por ciento de emisión a la longitud de onda a la cual una substancia absorbe un mínimo de energía radiante.	
Energía radiante dis- persada.		Toda energía radiante que llega al detector a longitudes de onda que no corresponden a la posición espectral considerada.	

(De: Henry, J.R., Cannon, C.D. y Winkelman, W. F. (1) )

### III. LEYES DE LA COLORIMETRIA

Las leyes de Lambert-Bouguer-Bunsen-Roscoe-Beer, son indispensables para entender y usar la espectrofotometría o cualquiera de sus derivados (flamometría, nefelometría, etc.). A esta ley se le llama, por simplicidad, ley de -- Beer; pero debe tenerse en cuenta que las cinco personas-arriba mencionadas, participaron en su elaboración.

Bouguer estableció que una substancia absorbente, de igual grosor, absorberá siempre una fracción constante de la energía que incide en ella; esto no es difícil de entender y se explica por sí solo (2).

El estudio de las leyes de la colorimetría fue contnuado por Bunsen, Roscoe, Beer, Yoe, y muchos otros investigadores, los cuales han añadido nuevos conceptos y han estudiado tanto el aspecto físico como el matemático, hasta llegar a la expresión actual (1, 2, 3, 4, 10):

$$\frac{P}{P_0} = T,$$

donde:

P es la energía radiante transmitida por la solución.  
P<sub>0</sub> es la energía radiante transmitida por el disolvente puro, o el disolvente más reactivos. O expresado de otra manera, la energía radiante incidente sobre la-

cupeta que contiene el disolvente puro o con los --- reactivos.

T es la transmitancia, es decir, la medida de la relación entre la energía incidente y la transmitida.

Otra forma de expresar matemáticamente esta ley es:

$$P = P_0 \times 10^{-abc}$$

donde las literales conocidas conservan su significado y sólo añadiremos que:

a es la constante de absortividad.

b es la longitud del trayecto que recorre la luz a través de la solución, y normalmente se expresa en centímetros.

c es la concentración del absorbente en la solución.

Esta expresión puede transformarse en:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-abc}$$

o sea que:  $T = 10^{-abc}$

Cuando  $P = P_0$  tenemos que  $P/P_0 = 1$ , lo cual significa que la energía radiante transmitida es igual a la energía radiante incidente. Por ello, cualquier solución que absorba, en mayor o menor grado, debe presentar una relación  $P/P_0$  menor de 1 y como puede presentarse alguna dificultad para manejar estas cifras decimales, se multiplica por cien para obtener el %T (por ciento de transmitancia).

Finalmente, la ley de Beer se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{P_0}{P} = 10^{abc}$$

si se calcula el logaritmo tenemos:

$$\log. \frac{P_0}{P} = abc$$

Como el término  $\log. P_0/P$  es conocido como absorban-  
cia, de donde, por lo tanto,

$$abc = \text{Absorbancia}$$

$$A = \log. P_0 - \log. P$$

Y,

Como  $P_0$  y  $P$  representan la energía radiante inciden-  
te y la transmitida, respectivamente, en %T; y si  $P_0 = 100$   
tenemos:

$$A = \log. 100 - \log. \%T$$

$$A = 2 - \log. T = abc$$

Como los valores de  $a$  y  $b$  son constantes, nos queda-  
que:

$$A = abc = Kc$$

$$K = \frac{A}{c}$$

Y,

Si tenemos dos soluciones del mismo soluto, a dife-  
rentes concentraciones, tenemos que:

$$A_1 = Kc_1 \quad \text{y} \quad A_2 = Kc_2$$

de donde, como  $K$  sigue siendo constante,

$$\frac{A_1}{c_1} = \frac{A_2}{c_2} ; \text{ o bien } \frac{A_1}{A_2} = \frac{c_1}{c_2}$$

Si la absorbancia del patrón se divide entre la concentración del mismo, se obtiene un factor (F), cuyo valor permanece constante y el cual nos servirá para calcular la concentración del soluto problema en la solución - problema.

Supongamos que al efectuar una determinación X, tenemos los siguientes datos:

Concentración del patrón =  $c_1 = 0.5 \text{ mg./50 ml.}$

Absorbancia del patrón =  $A_1 = 0.2218$

Concentración de la solución problema =  $c_2 = ?$

Absorbancia de la solución problema =  $A = 0.6989$

Volumen de la solución problema = 25 ml.

Para encontrar la concentración del analito problema aplicamos la fórmula:

$$c_2 = F \times A_2,$$

pero debemos corregir para los volúmenes empleados, y por lo tanto,

$$c_2 = F \times A_2 \times \frac{50}{25}$$

como  $F = \frac{A_1}{c_1}$ , tenemos:

$$c_2 = \frac{A_1}{c_1} \times A_2 \times \frac{50}{25}$$

Finalmente, substituyendo en la ecuación anterior,

$$c_2 = \frac{0.2218}{0.5} \times 0.6989 \times \frac{50}{25} = 0.62 \text{ mg./50 ml.}$$

Como tenemos que expresar la concentración de los - analitos en dos formas, la tradicional y la contemporá---nea; la primera en mg./100 ml. y la actual en mM/ℓ, habrá que efectuar los cálculos pertinentes. Si al hacer la de terminación de urea en suero obtenemos 31 mg./100 ml., de beremos efectuar los siguientes cálculos:

Peso Molecular de la Urea = 60, y por lo tanto:

60 g. ----- 1 mol de urea, y

60 mg. = 1 mM de urea.

Finalmente, 31 mg./100 ml. = 310 mg./lt.

Ahora establecemos la relación 60 mg. ----- 1 mM

310 mg. ----- X,

de donde:

$$X = 5.16 \text{ mM/ℓ} = 5.16 \text{ U.S.I.}$$

#### IV. COLORIMETROS OPTICOS

Debido a que gran parte del trabajo cuantitativo en química clínica se basa en la medición del color o de la luz, se deben considerar los principios físicos involucrados y los fundamentos de los procedimientos instrumentales.

Muchos métodos para efectuar el análisis cuantitativo de la sangre o la orina se basan en la separación de la sustancia de interés y en su conversión química para formar una molécula capaz de absorber energía radiante. Si el producto de la reacción, en solución, absorbe luz en la región visible del espectro, la solución será colorida y puede emplearse la intensidad de dicho color como una medida de la concentración.

En un cierto grado la intensidad de un color puede ser estimada por el ojo humano; las determinaciones que involucran la estimación cuantitativa de un color, son conocidas como análisis colorimétricos y también pueden efectuarse mediante instrumentos.

El color se produce cuando longitudes de onda específicas del espectro visible son absorbidas, como ejemplo, pensemos en una solución de color azul; esta solución es azul porque absorbe una proporción pequeña o abundante de

los componentes azules de la luz blanca que pasa a través de ella; por lo tanto la luz blanca emerge con menor intensidad y tendrá preponderancia de las longitudes de onda azules.

Los procedimientos analíticos basados en la medición directa de la absorción de la luz a longitudes de onda específicas, son llamados procedimientos fotométricos. Tanto la colorimetría como la fotometría se basan en la absorción característica de longitudes de onda de energía radiante dadas (cada longitud de onda corresponde a una diferente cantidad de energía). Para evitar confusiones definamos un procedimiento colorimétrico como aquel en el cual una solución que representa a la substancia problema en una concentración desconocida se llega a aparear con un color de comparación que representa a dicha substancia en una concentración conocida.

Un procedimiento fotométrico es aquel basado en la medición directa de la intensidad del color, en términos de poder de absorción de luz, de la solución, a una longitud de onda específica.

Por lo tanto en la colorimetría la substancia debe ser colorida por sí misma o en su defecto, capaz de sufrir reacciones que lleven a la producción de una molécula colorida y, además, la intensidad del color debe depender de la concentración, pues de lo contrario la reacción no tiene valor alguno.

Por lo tanto, un procedimiento colorimétrico involucra tres operaciones:

- 1). Preparación de la solución colorida
- 2). Obtención de un patrón adecuado
- 3). Apareamiento del color

Si la substancia es colorida, la preparación de la solución colorida es sencilla y puede suceder que sea suficiente efectuar una dilución de la muestra para producir un color de intensidad adecuada para compararlo con el patrón. Aún en estas condiciones normalmente es mejor separar el compuesto colorido para evitar la interferencia de cualquier material colorido o incoloro, antes de realizar la determinación.

Existen factores como el tiempo de calentamiento y enfriamiento, orden de adición de los reactivos, edad de los mismos y la temperatura de la solución, que afectan la intensidad final del color, obtenido después de efectuar la reacción productora del mismo. Por ello, para obtener resultados precisos y reproducibles es indispensable que todos los pasos del procedimiento se realicen bajo condiciones reproducibles.

Como los métodos colorimétricos solo son válidos --- cuando se compara la intensidad de color del desconocido contra la del patrón, es obvio que éste último es de gran importancia. El patrón de comparación que debe usarse es aquel que se obtiene tratando una concentración conocida de la substancia problema, simultáneamente y bajo las mismas condiciones, puesto que así muchos factores no específicos que afectan la intensidad del color, influirán en la misma proporción tanto sobre el patrón como sobre el problema.

En algunos procedimientos se requieren patrones que contengan sustancias que son difíciles de obtener en forma pura (bilirrubina), o que se deterioran rápidamente por lo cual han surgido patrones "artificiales", los cuales consisten en soluciones estables a base de colorantes o sales inorgánicas. Al emplear este tipo de soluciones, el problema es tratado por el método habitual y después se le compara con el patrón. Con algunas excepciones, es estos patrones son satisfactorios solamente cuando se requiere obtener resultados aproximados, pero nunca deben emplearse para evitar la preparación de un patrón primario exacto (8).

#### COLORIMETROS.

Son instrumentos que se utilizan para facilitar la comparación de dos soluciones coloridas, de manera tal que una de ellas, de concentración desconocida, se compara con la otra de igual intensidad, pero de concentración conocida, y la concentración de la primera se determina por esta comparación.

Se puede producir la comparación o igualación de intensidad de color en diversas maneras, las cuales pueden resumirse como sigue:

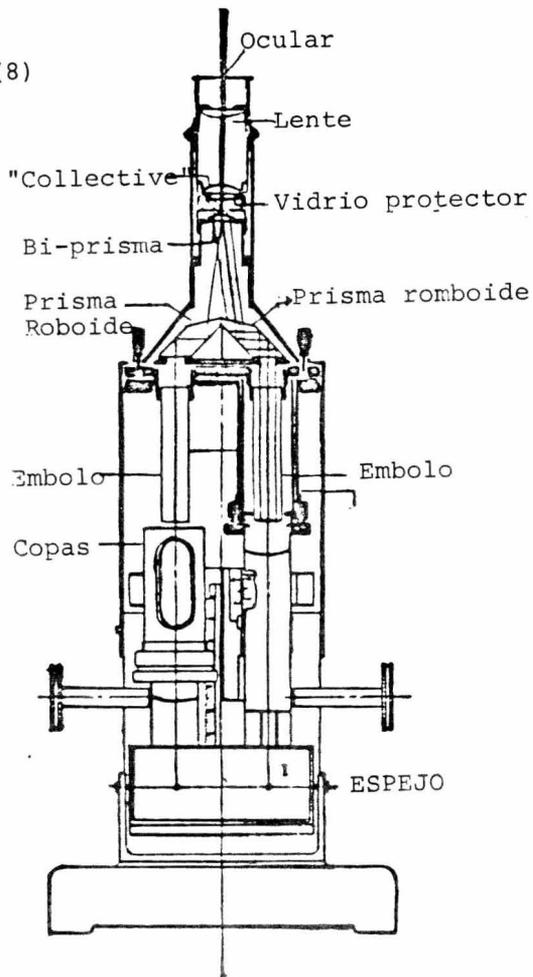
- 1). Por comparación contra una serie de patrones.- La solución colorida problema se compara, por inspección, contra una serie de patrones coloridos que representan a la sustancia por determinar, en diferentes concentraciones. La concentración del desconocido está dada por la concentración de aquél con el cual el apareamiento es más próximo.

- 2). Por duplicación del color.- En este método, a una solución patrón concentrada se le agrega un "blanco" -- que contiene los mismos reactivos empleados en la --- muestra, hasta que el color se iguale con el de esta última. El volumen de solución tipo requerido para preparar el duplicado es una medida de la cantidad de la substancia problema presente en la muestra; algunos autores llaman a este método titulación colorimétrica.
- 3). Por dilución.- El problema o el tipo se diluye con -- agua u otro disolvente, hasta que la intensidad de am bos colores se iguala, cuando se comparan bajo condiciones similares de iluminación y profundidad de solu ción a través de la cual pasa la luz. Por lo tanto, -- si el problema debe diluirse al doble de su volumen -- original para igualarlo, se supone que su concentración original es el doble de la del tipo, y en general si dos soluciones coloridas que difieren en con-- centración se igualan por dilución de una de ellas, -- la concentración original de la solución diluida es -- igual a la concentración de la solución sin diluir, -- multiplicada por la proporción de volumen final a ini cial de la primera.
- 4). Variando la profundidad de la solución a través de la cual pasa la luz.- Este procedimiento es la base del colorímetro visual y se fundamenta en la ley de Beer, la cual tratamos en el Capítulo III.

El dispositivo empleado para llevar a cabo esta técni ca consiste de un elemento por medio del cual, se -- puede variar el grosor de la solución colorida, tanto

en el tipo como en la muestra que se examina, de modo que las intensidades de color varíen en una amplia escala; el colorímetro Duboscq, que se muestra en la figura 3.1, es el aparato utilizado en este caso (3, 5, 6, 11).

FIG.3.1 (8)



METODO COLORIMETRICO DE DUBOSCO.

- 1). Las soluciones que han de compararse, se colocan en vasos especiales de cristal que se mueven hacia arriba y abajo mediante piñon y cremallera. Unos cilindros de cristal entran y salen de dichos vasos y el exceso de líquido se dispone entre aquellos y las paredes de éstos; así, bajando o subiendo los soportes con el tornillo de cremallera, se puede hacer que la capa de líquido comprendida entre el fondo de los vasos y las extremidades de los émbolos tenga el grosor que se desee; este último está indicado por una escala.

Debajo de los vasos hay un espejo que refleja la luz a través de ellos y del eje mayor de los émbolos hacia un juego de prismas. Estos últimos dirigen la luz hacia un campo único que puede ser observado por medio de un ocular dispuesto en la parte superior. - Cada mitad lateral del campo recibe la luz del vaso respectivo. Al bajar y subir los vasos se aumenta o disminuye el espesor de la capa líquida atravesada por la luz, aumentando o disminuyendo, en consecuencia, el color de la mitad correspondiente del campo.

- 2). Antes de usar el aparato, es preciso comprobar el -- ajuste de las escalas. Se levantan lentamente los vasos hasta que sus bases quedan en contacto con los émbolos respectivos y si en tal momento las dos escalas, que son movibles en la mayor parte de los aparatos, no están marcando exactamente cero, se hace preciso un ajuste. Si las escalas no son móviles, después de la lectura se procede a la corrección de los

resultados en cada lado, de modo que se conozca el verdadero grosor del líquido comprendido entre la base de los émbolos y el fondo de los vasos.

- 3). También debe comprobarse si hay igual transmisión de luz en los dos lados del colorímetro, lo cual se obtiene colocando una solución colorida en ambos vasos teniendo cuidado de no llenarlos demasiado para que al desplazarse el líquido por la presión de los émbolos, no se derrame. Entonces se suben los vasos hasta que ambos émbolos se sumerjan a igual profundidad. Puede emplearse luz natural o artificial; en el primer caso, el espejo y el instrumento se colocan de modo que se refleje por ambos vasos igual cantidad de luz. Si ambos lados no están igualados, -- puede modificarse la posición del espejo y/o la del aparato, para lograr dicha igualdad. Si aún así ésta no se logra, el sistema óptico de ambos lados es diferente o puede ser debido a la formación de burbujas sobre los émbolos.

En caso de emplear luz artificial, basta mover el espejo hasta encontrar la posición en la cual se logra la igualdad.

- 4). Una vez ajustado el colorímetro en relación con la fuente luminosa, no debe moverse de posición. Se vacía el vaso izquierdo y se enjuaga con la solución patrón; se llena parcialmente el vaso y se eleva hasta que el émbolo quede sumergido, evitando que se -- formen burbujas sobre este último. Dicho vaso se -- dispone a la profundidad conveniente, por lo general 10, 15 ó 20 unidades, según la concentración y --

se modifica la altura del vaso de la derecha en el cual está el líquido problema, hasta que ambas mitades del campo tengan igual intensidad de color. Entonces se lee la escala y se anota la altura. Para mayor exactitud debe hacerse una serie de lecturas y sacar el promedio de éstas.

Cuando la intensidad del color es igual, las concentraciones de ambas soluciones son inversamente proporcionales a sus respectivas alturas, aceptando que siguen la ley de Beer. Tal relación puede expresarse de la siguiente manera:

$$\text{Concentración del líquido problema} = \frac{\text{lectura del patrón}}{\text{lectura del problema}} \times \text{concentración del patrón.}$$

- 5). Para expresar los resultados en concentración por 100 ml., se modifica la fórmula por dos factores más: a) La proporción de sustancias problema en 100 ml. y b) Los volúmenes a que se han diluido el patrón y la solución desconocida para la comparación del color.

Estas condiciones varían en cada determinación y los cálculos se dan por separado en cada método. Ejemplificando: En la determinación de nitrógeno proteico, el patrón contiene 0.15 mg. de nitrógeno en un volumen final de 50 ml. y la solución desconocida, equivalente a 0.5 ml. de sangre (5 ml. de dilución 1:10), es de un volumen final de 25 ml. Si el patrón está en el vaso situado a la izquierda del colorímetro, marcando una altura de 20 mm. y la solución desconocida en el vaso de la derecha, con una -

lectura de 24, la concentración de la solución que se examina, en mg./100 ml. es:

$$20/24 \times 0.15 \times 50/25 \times 100/0.5 = 15000/300 = 50$$

Se puede simplificar el cálculo colocando la solución desconocida en el vaso de la izquierda, a una profundidad elegida según la concentración del patrón, de tal modo que esta concentración sea un múltiplo de la cifra a la cual se fija el vaso con la solución desconocida. Así, en la determinación de nitrógeno no protéico, puesto que el patrón contiene 0.15 mg. en 50 ml., si la solución desconocida se sitúa a 15 mm., entonces, usando la fórmula general, la concentración de esta última por 100 ml. es:

lectura del patrón/15 x 0.15 x 200,  
lo cual se reduce a 2 x lectura del patrón.

- 6). Los resultados son más exactos en las determinaciones colorimétricas siempre que la intensidad del color en el patrón y en el problema sea casi la misma.
- 7). Cuando la absorción luminosa, después de producirse la reacción colorida, es más intensa en una porción del espectro, algunas veces es ventajoso el uso de filtros de luz que sólo dejen pasar esa parte del espectro, lo cual puede eliminar el enturbiamiento producido por la absorción luminosa de las demás partes del espectro, por substancias extrañas (5, 6, 1<sup>o</sup>).

## V. FOTOCOLORIMETROS

---

El fotocolorímetro se basa en la propiedad que tiene la luz de crear un potencial eléctrico en una célula fotoeléctrica. Puesto que la corriente de salida de la célula depende de la intensidad de la luz que incide en ella, se deduce que no sólo se hallará afectada por las soluciones coloridas interpuestas entre ella y la fuente luminosa, sino también por la interposición de soluciones turbias. La intensidad de luz se mide por medio de un circuito eléctrico que comprende una resistencia y un galvanómetro que oscila sobre una escala indica, en unidades arbitrarias, la cantidad de corriente generada, o se gobierna la oscilación mediante una resistencia variable -- que se mide sobre una escala arbitraria.

Para la luz monocromática, la relación entre la intensidad luminosa que sale de la solución colorida y la que entra, es una función logarítmica de la concentración (8).

### COLORIMETROS DE UNA CELULA.

El medidor de estos aparatos está graduado de cero a cien, y por ello da transmitancia en por ciento. La fuente de luz se opera mediante dos baterías secas o por una línea de corriente alterna a través de un transformador de voltaje.

Los filtros se encuentran lo suficientemente cercanos a la fotocelda para evitar interferencias debidas a luz perdida. Estos se encuentran permanentemente montados en un disco giratorio o pueden ser insertados a medida que se necesiten.

La fotocelda está herméticamente sellada en una atmósfera inerte. Para operar este aparato, debe ajustarse a una lectura de 100 en el medidor, con agua o con el "blanco de reactivo" y se coloca el filtro adecuado; el "blanco" se reemplaza con la solución problema y se toma la lectura. Este valor da la transmitancia de la muestra en %. La mayoría de los instrumentos tienen sobrepuesta la escala de densidad óptica y en el caso que ésta no esté, la absorbancia puede obtenerse mediante la fórmula:

$$A = 2 - \log. \%T \dots (4.1)$$

Como cubetas pueden emplearse desde tubos de ensayo hasta cubetas rectangulares, específicamente diseñadas para estos instrumentos.

Otro tipo de instrumentos de una sola celda emplean un galvanómetro cuya escala está graduada linealmente de 0 a 100; en estos instrumentos una vez colocado el filtro adecuado se inserta la cubeta conteniendo el patrón y se ajusta la intensidad de la luz hasta obtener una lectura de 100; se coloca el problema y se obtiene la lectura. Para encontrar la concentración se emplea la fórmula 4.1.

A continuación presentamos el diagrama de un fotocolorímetro de una celda:

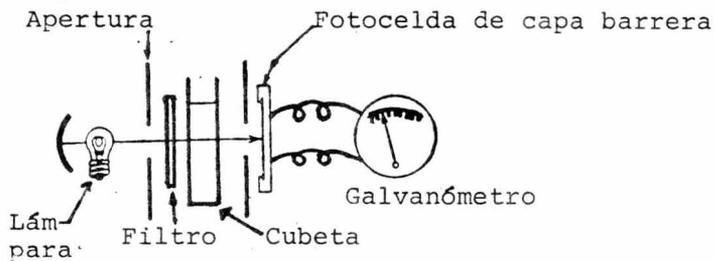


FIG. 4.1 (10)

Como ejemplo de aparato de dos celdas, tenemos el fo to co lo ri me tro de Klett-Summerson, que es una unidad que puede conectarse a cualquier generador de corriente alterna o directa, gracias al efecto de compensación de la doble célula fotoeléctrica.

Primeramente se coloca la cubeta conteniendo el patrón, en el trayecto de luz que incide sobre una de las fotoceldas, las cuales están dispuestas en un circuito po te nc io m é tr ico de manera que la corriente de una celda es opuesta a la de la otra mediante un instrumento de puntouno (galvanómetro de baja sensibilidad).

Con la escala marcando cero (correspondiendo a cero de absorbancia), la corriente que emerge de la segunda celda se ajusta para que balancee la que proviene de la celda que recibe la luz que atraviesa la solución. Este balance está indicado por una lectura de cero en el galvanómetro. Se coloca la solución problema y cualquier absorción de esta solución eliminará el balance eléctrico que existe entre ambas fotoceldas, el cual se restaura moviendo el selector del potenciómetro hasta que se obtenga una lectura de cero. La lectura obtenida al balancear ambas fotoceldas es una medida de la absorción de la solución.

La elección de los filtros depende del procedimiento analítico que se emplee; en general, debe elegirse aquél que tenga una transmisión del espectro opuesta a la de la solución que se examina, es decir, el filtro que deje pasar la mayor cantidad de luz en la escala donde la sustancia presente una mayor absorción.

Sin embargo, en algunos casos, los colores producidos sobrepasarían la capacidad del instrumento si se empleasen tales filtros (como en el método de Folín-Wu), por lo que deben usarse filtros que absorban luz de la misma gama que la solución.

La escala de este instrumento está graduada en unidades que son proporcionales a la densidad óptica. Los valores numéricos representan la absorbancia multiplicada por dos y omitiendo el punto decimal, por lo tanto una lectura de 250 corresponde a una D.O. de 0.500. En general, la relación entre la lectura de la escala (L) y la D.O. -

es (6, 8, 10):

$$L = \frac{1000 \times \text{D.O.}}{2} \dots\dots (4.2)$$

La representación esquemática del fotocolorímetro de Klett-Summerson se presenta a continuación:

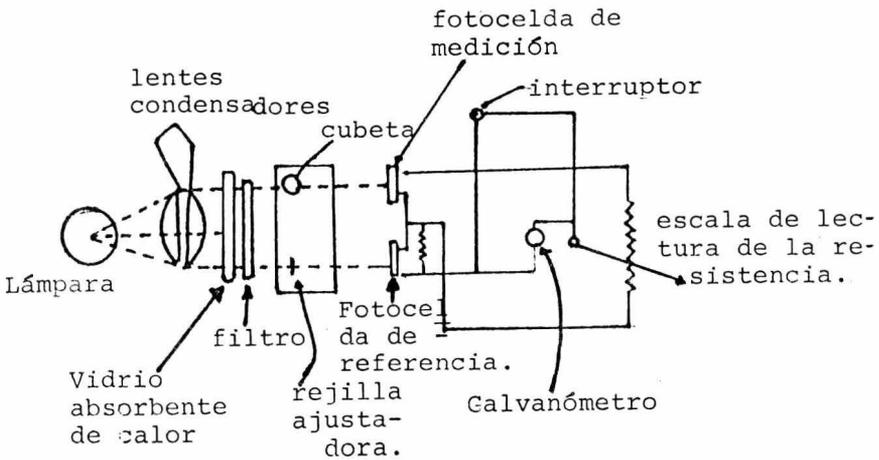


FIG. 4.2 (10)

## VI. ESPECTROFOTOMETROS

### INTRODUCCION

Las mediciones fotométricas son muy usadas en la química clínica, siendo las razones para ello: rapidez, especificidad adecuada y sensibilidad aceptable. Debido a -- que este tipo de mediciones tiene un campo de aplicación tan amplio, es necesario tener un concepto claro de los aspectos teóricos y prácticos así como de los instrumentos que se emplean.

Básicamente, hacemos uso de las propiedades que permiten a los átomos y moléculas absorber o emitir energía en alguna de las regiones del espectro electromagnético. Es muy común interpretar a este último en términos de luz y color, pero es más adecuado pensar en términos de energía, puesto que realmente se trata de ella, propagándose en forma de ondas constituidas de tal manera que mientras más cerca estén las crestas, mayor es la energía; la distancia entre crestas es la longitud de onda y su rango de magnitud va desde menos de 0.1 nm. hasta algo más allá de 25 cm (2).

Se puede definir la espectrofotometría de absorción como la medición de la atenuación, provocada por un material de prueba, de la radiación incidente que está espec-

tralmente definida.

En química clínica las mediciones se efectúan normalmente en el rango espectral de 220 a 800 nm. Este rango está subdividido en región visible, que se encuentra por arriba de los 380 nm.; región ultravioleta, por debajo de los 380 nm. y región infrarroja, que se encuentra sobre los 800 nm.; ésta tiene poca aplicación en el trabajo de laboratorio clínico (1).

Finalmente debemos recordar que la espectrofotometría, usando comparadores visuales, se ha practicado por más de un siglo, mientras que las técnicas fotoeléctricas se han puesto en práctica hace unos 50 años.

#### PRINCIPIOS

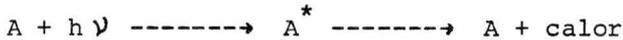
La espectrofotometría también puede ser definida como la medición del poder que tiene una solución colorida para transmitir la luz, dato a partir del cual puede determinarse la concentración de las substancias que se encuentren presentes en dicha solución y sean capaces de absorber energía.

La espectrofotometría puede aplicarse para medir la transmisión de energía en las regiones ultravioleta, infrarroja y visible del espectro de energía radiante.

Los instrumentos utilizados para medir la transmisión a diferentes longitudes de onda, son los espectrofotómetros y los colorímetros fotoeléctricos, dependiendo este nombre de particulares diferencias en la construcción del aparato. La diferencia que existe entre ellos es que los últimos solo se pueden usar en la región visi-

ble del espectro de energía radiante, además de que no -- pueden emplearse si no es con un filtro monocromador, y - los espectrofotómetros pueden variar en su empleo de lon- gitud de onda.

En el proceso de absorción, un fotón incidente cede su energía a una molécula presente en la solución a me- --- dir, lo cual produce la excitación de la misma a un nivel energético mayor. Este proceso puede representarse como:



en la cual A es la molécula que absorbe la energía; A\* - es la misma molécula, pero en estado excitado; y  $h\nu$  es - la energía de el fotón incidente, siendo h la constante- de Planck y  $\nu$  la frecuencia.

A\* es muy inestable y rápidamente revierte al esta- do de menor energía, cediéndola en forma de calor.

La habilidad que posee una solución para transmitir- la luz es medida como una función de la concentración de- las moléculas en disolución y coloridas, y es conocida co- mo la transmitancia, T, de la solución.

Se define la transmitancia como la relación existen- te entre la intensidad,  $I_2$ , de la luz emergente del por- ta-muestra que contiene la solución y la intensidad  $I_1$ , - de la energía incidente en la solución, ambas medidas a - la misma posición espectral y longitud de onda, es decir,

$$T = I_2 / I_1 \text{ ..... (5.1)}$$

En todo procedimiento fotométrico hay una cierta proporción de luz que se pierde, al pasar por la solución, - debido a reflexiones, dispersiones y absorción por disolventes, reactivos y posibles contaminantes. Por ello, se debe tener presente la reducción de la intensidad de la - luz, provocada por factores ajenos a la absorción de la - sustancia de interés. Para determinar la magnitud de este efecto, se debe conocer la transmitancia relativa, para lo cual se comparan, en condiciones equivalentes de -- longitud de onda, intensidad de luz incidente y profundidad de solución, la transmitancia de una solución que contiene un material absorbente de energía ( $T_{\text{soluc.}}$ ) y la -- transmitancia del disolvente o "blanco de reactivo" - - - ( $T_{\text{disol.}}$ ). Entonces, la transmitancia,  $T_s$ , está dada por

$$T_s = T_{\text{soluc.}} / T_{\text{disolv.}} \dots \dots (5.2)$$

De esta manera no se requiere determinar la pérdida- inespecífica de luz; ni la intensidad de la luz incidente y los reactivos que absorben luz no interfieren en la de- terminación.

El cambio en transmitancia debido a la presencia de- la sustancia de interés, se determina por el incremento- de la absorción de energía por arriba de un nivel, arbi-- trariamente tomado como cero. La absorción cero es la -- del disolvente o "blanco de reactivo", tomada en condicio- nes equivalentes de medición.

La transmitancia ( $T_s$ ), es siempre menor de 1.00 si - existe material absorbente en la muestra, y puede expre-- sarse numéricamente como fracción decimal o en por cien--

to.

Una manera satisfactoria de expresar la transmitancia de una solución es en términos de su logaritmo negativo ( $-\log. T_s$ ), conocido como densidad óptica (D.O.) y también designado con los nombres de absorbancia (A) o extinción (E) de la solución. Por lo tanto:

$$D.O. = \log_{10} (1/T_s) = -\log_{10} T_s = 2 - \log_{10} T_s$$

..... (5.3)

Finalmente enunciaremos, de una forma sencilla, lo que sucede en un espectrofotómetro: Se pasa luz monocromática a través de una celdilla o tubo conteniendo la solución problema y la luz emergente de ésta incide en un mecanismo fotosensible que convierte la energía radiante en energía eléctrica; la corriente producida es medida -- por un microgalvanómetro o un microvoltímetro. (1)

#### COMPONENTES BASICOS DE UN ESPECTROFOTOMETRO

Los componentes son:

1. Fuente de poder, que proporcione energía eléctrica regulada.
2. Fuente de energía radiante.
3. Monocromador para eliminar longitudes de onda no deseadas.
4. Porta-muestras.
5. Sistema receptor para captar la energía transmitida y convertirla a eléctrica que pueda ser medida
6. Dispositivo para medir la corriente generada.

### 1. Fuente de Poder

Las constantes fluctuaciones del voltaje que se presentan en la red de abastecimiento de fluido de energía eléctrica producen efectos indeseables en el funcionamiento de los aparatos de medición. Por esta razón se requiere una fuente de energía que sea capaz de proporcionar -- energía eléctrica regulada para los propósitos específicos del instrumento que se utiliza.

Estas pueden ser de tres categorías: baterías, reguladores de voltaje y fuentes de poder electrónicas.

**Baterías.** Estas producen voltajes estables, trátense de baterías secas o húmedas, pero no tienen la suficiente capacidad para operar todos los instrumentos.

Las baterías secas se usan para pequeños fotómetros, especialmente de tipo portátil; algunos instrumentos de este tipo usan baterías alcalinas o de níquel-cadmio, pero éstas sólo sirven para equipo que requiere poca corriente.

Las baterías húmedas de plomo y ácido, como las usadas por los automóviles, producen corriente estable, pero también están limitadas a instrumentos de bajo requerimiento eléctrico y no son fácilmente portables. Además este tipo de fuente de poder requiere un mantenimiento, a intervalos regulares, consistente en adición de agua y recargas constantes para alcanzar la tensión de voltaje mínimo indispensable, mismo que es mayor puesto que puede alcanzar una ligera sobrecarga y al conectar el instrumento se debe esperar un período de tiempo apropiado para -- que éste se estabilice. El voltaje permanece constante -

hasta que casi se ha descargado la batería y después empieza a decaer. Por lo tanto, al principio y final del ciclo de carga-descarga, ocurren variaciones considerables.

Fuentes Electrónicas. Estas emplean circuitos totalmente electrónicos, con tubos al vacío o transistores, -- asegurando una regulación muy precisa. Podemos, por tanto, considerar más útiles aquellas que emplean los tubos al vacío, puesto que cualquier persona es capaz de reemplazarlos si hay necesidad, pero no cualquier individuo puede manipular los componentes de aquellas fuentes transistorizadas, por otro lado el consumo de corriente eléctrica de los circuitos transistorizados es mínimo.

En todos los casos, ya sean reguladores de voltaje o circuitos electrónicos, se consume corriente alterna, y se suministra corriente directa, esto a una tensión pareja, sin fluctuaciones, lo que es realmente el objetivo de estos circuitos (2, 4).

## 2. Fuente de Energía Radiante

La función de la fuente de energía radiante es la de proporcionar luz incidente de suficiente intensidad para efectuar la medición.

Un espectro continuo contiene todas las longitudes de onda presentes, el ejemplo clásico de una fuente de radiación continua es la lámpara de tungsteno, en la cual se representan longitudes de onda de 350 a 1000 nm.

A la temperatura del filamento del tungsteno, parte del metal se evapora y condensa en las paredes de vidrio-

de la lámpara, formando una capa que decremента la intensidad de la energía, cambiando el espectro a tal grado -- que provoca fluctuaciones en la respuesta del instrumento. Cuando penetra aire a la lámpara se provoca la formación de una capa de óxido de tungsteno en las paredes de la misma, y ésta se quema.

La mayor parte de la energía que emiten estas lámparas se localiza en la región infrarroja y sólo el 15% en la región visible. Para aumentar el porcentaje emitido -- en el visible se puede aumentar la temperatura, aumentando el voltaje, pero este procedimiento acorta en forma -- drástica la vida de la lámpara.

La lámpara de vapor de mercurio de baja presión emite un espectro discontinuo, muy útil para propósitos de -- calibración, pero no para mediciones. Las lámparas de hidrógeno o deuterio son fuentes de radiación adecuadas para trabajar en la región ultravioleta, de 200 a 375 nm. -- Para este mismo fin pueden utilizarse también las lámparas de mercurio de alta presión y las de xenón.

Es importante que el filamento de la lámpara, cualquiera que ésta sea, sea perpendicular al eje óptico del instrumento, tanto vertical como horizontalmente.

Una lámpara incandescente, como la de tungsteno, --- irradia una cantidad considerable de calor y ello puede -- afectar la transmitancia de los filtros y/o de las muestras; para evitar este efecto es necesario filtrar los rayos de calor, lo cual se logra con un filtro claro, fabricado de un material especial que tiene la cualidad de absorber el calor. El efecto de la temperatura es de mayor

importancia en aquellos aparatos que utilizan como detectores las celdas fotoconductoras o las de capa de barrera, puesto que estos elementos son muy sensibles a la temperatura (1, 2, 3, 4, 10).

### 3. Monocromador.

Cuando se mide la absorción o emisión de energía radiante de una solución, es necesario aislar la longitud de onda deseada y excluir las demás. En otras palabras, restringiendo la banda de longitudes de onda que pasan a través de la muestra, a aquellas absorbidas por la sustancia de interés, la sensibilidad es aumentada.

El dispositivo más sencillo para lograr el efecto deseado es un filtro; los filtros generalmente están compuestos de sales metálicas disueltas o suspendidas en vidrio, gelatina o cualquier otro material transparente, -- por ejemplo, sales de cromo o cobalto, etc. Anteriormente se usaban matraces u otros recipientes que contenían soluciones coloridas, pero tienen la desventaja de ser muy frágiles.

Podemos considerar que existen dos clases de filtros, los de vidrio y de gelatina por una parte, y los filtros de interferencia por otra (4).

Filtros de Vidrio. Pueden ser de tres tipos: filtros de corte, que producen un corte en el espectro, con una absorción total en un lado y alta transmitancia en el otro. El segundo tipo de filtro está representado por los tintes neutros o grises, los cuales tienen una absorción relativamente constante en un rango espectral amplio. El tercero, y más común tipo de filtro es el com-

puesto, el cual transmite exclusivamente en una banda limitada; está formado por una combinación de filtros de corte cementados entre sí.

**Filtros de Gelatina.** También llamados Wratten, confeccionados con gelatina coloreada, que es cementada entre dos placas de vidrio. Este tipo de filtros tiene graves desventajas, puesto que son muy sensibles al calor y a productos químicos que al ser derramados sobre las orillas del vidrio pueden penetrar y disolver o deteriorar en alguna forma la gelatina.

**Filtros de Interferencia.** Están formados por dos paredes de vidrio recubiertas con una delgada capa de plata, entre ambas paredes se encuentra un material dieléctrico de espesor rigurosamente controlado. Este espesor determina la longitud de onda que podrá pasar a través de él. Solo aquellas longitudes de onda que sean múltiplos del espesor permanecerán en fase, mientras se reflejan en el dieléctrico antes de emerger; las demás se cancelarán debido a diferencias de fase durante el proceso de reflexión y no serán transmitidas.

En otras palabras, cuando la luz incide en el dieléctrico, parte de ella es reflejada de la superficie frontal, mientras que la luz que penetra es reflejada por la superficie opuesta. Estos últimos rayos han viajado más que los primeros, una distancia igual al espesor del dieléctrico. Si los dos rayos reflejados están en fase, su intensidad se duplica, mientras que si están desfasados se anulan mutuamente; por lo tanto, cuando la luz blanca incide en el filtro algunas longitudes de onda serán au--

mentadas y otras serán destruidas, produciéndose color. - Los filtros de interferencia son de dos tipos:

a) El efecto de interferencia se obtiene como resultado de una reflexión múltiple entre dos capas de metal - paralelas y parcialmente transparentes, colocadas muy cerca una de la otra. El principio de interferencia predice que este tipo de filtro pasará una serie de regiones espectrales a ciertos intervalos; por lo tanto, si el filtro tiene su máxima transmitancia de primer orden a 700 nm., los máximos de segundo y tercer orden serán a 350 y 233 nm. respectivamente ( $\lambda$ ,  $\lambda/2$ ,  $\lambda/3$ ).

El uso de los máximos de primer orden ofrece la ventaja de proporcionar bandas más estrechas, pero tiene la desventaja de que las bandas indeseables adyacentes están muy cerca. Si estas bandas se encuentran dentro del rango de respuesta del aparato deben ser eliminadas por filtros de corte.

b) En este otro tipo de filtro de interferencia se reemplazan las capas metálicas con capas alternantes de varios materiales que difieren en su índice de refracción por lo que se le llama filtro de interferencia de capas múltiples. El máximo de transmitancia de este filtro puede llegar a ser de 90% y la anchura media de 4 nm. Las bandas adyacentes se encuentran en ambos lados del máximo y deben ser eliminadas con filtros de corte.

Se debe tener precaución de que los filtros de interferencia estén exactamente perpendiculares al trayecto óptico, puesto que cualquier desviación cambiará el grosor efectivo del material dieléctrico y consecuentemente-

cambiará las longitudes de onda que son transmitidas (1, 2, 4).

**Prismas y Rejillas de Difracción.** Estos elementos-- separan la mezcla de longitudes de onda emitidas por fuentes como la lámpara de tungsteno, por medio de refracción o difracción, y la presentan como un espectro del cual -- las longitudes de onda pueden ser seleccionadas.

**Prismas.** Estos dispositivos usan la refracción o -- "doblamiento" de la energía radiante para separar las longitudes de un espectro continuo en una progresión.

Las longitudes de onda más cortas son refractadas en un mayor grado que las más largas, lo cual produce un espectro no lineal y curvo.

Estas dos características, a saber, la producción de un espectro no lineal y curvo, obligan a tener dispositivos ópticos y mecánicos complejos para seleccionar una -- porción espectral dada con una pequeña anchura de banda.

Los prismas de vidrio son adecuados y satisfactorios para trabajar en las regiones visible y ultravioleta cercano, pero para el ultravioleta es indispensable que sean de cuarzo.

Al usar prismas o rejillas de difracción como elementos dispersantes, se requiere además el uso de aberturas, lentes y espejos colocados en arreglos variables, para -- proporcionar aberturas de entrada (por lo cual penetra la luz blanca) y de salida (por la cual emergen las bandas espectrales aisladas). Normalmente el control de estas -

aberturas se efectúan con un solo selector y se les mantiene constantes.

Rejillas de Difracción. Estos elementos producen un espectro lineal, no curvo. Se elaboran evaporando una capa delgada de una aleación de cobre-aluminio, sobre la superficie de una placa de vidrio plana y con una máquina se marca una serie de hendiduras o rendijas en la capa de metal. El número de éstas varía de uno a varios cientos por pulgada, y a mayor número de hendiduras, mayor es la dispersión.

La producción de rejillas de alta calidad es muy costosa, sin embargo, teniendo una de ellas se pueden hacer copias de la siguiente manera: se coloca un compuesto separador en la superficie de la rejilla, se aluminiza y se le pone una capa de resina epóxica, que endurece y copia la rejilla totalmente.

Estos elementos funcionan basados en el principio de que los rayos de energía radiante se refractarán al incidir en una esquina aguda, dependiendo en la longitud de onda el grado de refracción.

Cuando un haz de luz que contiene una mezcla de longitudes de onda diferentes incide sobre la rejilla, se produce una serie de espectros pequeños, uno por cada hendidura iluminada.

A medida que la mezcla de longitudes de onda incide en la rejilla, se forman frentes de onda, como cuando se tiran dos piedras a un estanque, donde éstas se cruzan las ondas que están en fase se refuerzan, y las que no lo

están se cancelan.

Algunas rejillas tienen anchuras de banda de 0.5 nm. pero las más económicas la tienen de 20 a 35 nm.

Las rejillas de difracción tienen serios problemas-- de desviación de luz, debido a que tienen miles de superficies y la perfección de las mismas es difícil de controlar. Si definimos la luz dispersada como aquella energía radiante de longitudes de onda no deseadas que llega al detector, se comprende porque las superficies de las rejillas deben estar perfectamente pulidas. Este fenómeno -- puede ser más fácil de evitar en el caso de los prismas, puesto que éstos poseen un número menor de caras y además éstas pueden pulirse en una manera bastante satisfactoria.

Para hacer frente a la luz dispersada, se usan dos monocromadores, es decir, se pasa el rayo de energía a través de dos monocromadores en serie y con ello se elimina la mayor parte de la luz desviada (1, 2, 4, 10).

#### 4. Porta-Muestras.

El receptáculo en el cual se coloca la muestra recibe el nombre de porta-muestras, cubeta, celda o celdilla.- Existen varios tamaños y formas de cubetas, y muchos aparatos comerciales están diseñados de tal manera que se pueden emplear varias de ellas, lo cual es deseable por dos razones:

- a). Hay ocasiones en que se desea hacer mediciones de muestras de volumen muy pequeño y se hace necesario efectuarlas en microcubetas.

- b). El cambio en la longitud del trayecto de luz, a través de la solución, es un método conveniente para acercar los valores de absorbancia a la región de mayor precisión fotométrica.

La mayoría de estos receptáculos están contruídos-- de vidrio, lo cual es satisfactorio para el rango de 320- a 1000 nm.; también se fabrican algunas cubetas de plásti- co para ciertos instrumentos. Para mediciones por debajo de los 320 nm. es necesario usar cubetas de cuarzo, aun-- que también éstas pueden usarse a longitudes de onda mayo- res.

Respecto a la forma, encontramos dos tipos de porta- muestras: Rectangulares y cilíndricas.

Rectangulares. Estas permiten una mayor precisión, - puesto que poseen caras paralelas hechas de vidrio óptico muy bien pulidas, lo cual elimina los errores que se ori- ginan por refracción y reflexión. Las paredes deben, de- preferencia, estar fusionadas en lugar de cementadas.

Existen dos tipos de fuente de error en estos porta- muestras, ninguno de los cuales es de consecuencias se--- rias: La energía radiante que ha pasado a través de la - solución puede ser reflejada hacia atrás por algún elemen- to del detector, y ésta puede a su vez volver a reflejar- se hacia el detector.

La otra fuente de error es la falta de homogenicidad del área receptora del detector. Por lo tanto, pequeñas- diferencias en las cubetas producen desviaciones del área iluminada por la luz transmitida.

Cilíndricas. Estas actúan como un lente cilíndrico para astigmatismo y debemos recordar que el índice de refracción de un lente es un factor importante en lo que -- respecta a la longitud focal del mismo y por tanto influye en la transmisión de luz hacia el detector.

En las cubetas hay variaciones en la cantidad de luz transmitida debido a pequeñas imperfecciones y por ello -- es necesario marcarlas de tal manera que siempre se coloquen en la misma posición al llevar a cabo las mediciones; -- normalmente esta señal es la marca de fábrica de las cubetas.

En general, hay pérdidas de energía radiante transmitida como resultado de la reflexión en la interfase vidrio-disolvente, debido a variación o diferencia del coeficiente de refracción del vidrio y el disolvente.

Finalmente, como las caras de las cubetas cilíndricas no están pulidas, aumentan los errores producidos por refracción y reflexión.

Microcubetas. Son fabricadas de cuarzo y pueden emplearse con volúmenes de 50, 75 y 100  $\mu$ l.; se requiere de un dispositivo especial al igual que de un diafragma para poder emplearlas (1, 2, 4, 10).

Calibración de las Cubetas. No puede confiarse ciegamente en las especificaciones de los fabricantes de cubetas, es decir, es conveniente probar que todas las cubetas de un "juego" sean iguales y si el caso lo amerita, -- se deben efectuar dos correcciones:

- a). La llamada "corrección de la "cubeta", se refiere a variaciones en la pérdida de energía, debidas a reflexión y dispersión de la radiación - en la superficie de la cubeta y a diferencias en refracción de las mismas, ya sea en el ángulo o en dispersión que provoquen que la radiación --- transmitida incida en diferentes áreas del detector.

Para efectuar dicha corrección:

- a). escoja una cubeta y denomínela "cubeta de referencia".
- b). Llene todas las cubetas con agua.
- c). Coloque la "cubeta de referencia" en el instrumento y ajuste la respuesta del mismo, arbitrariamente, a una absorbancia de 0.400.
- d). Lea la absorción de todas las demás cubetas.
- e). Registre las lecturas y la diferencia que éstas presenten, con respecto a la "cubeta de referencia", constituye la llamada "corrección de cubeta". Dichas diferencias deben ser sumadas o restadas según sea el caso, a todas las mediciones que se efectúen con esa cubeta en particular.

Este tipo de corrección debe determinarse para cada longitud de onda usada; si éstas no son mayores de 0.002, su valor es despreciable.

El segundo tipo de corrección se refiere a la variación de la longitud del trayecto que recorre la luz, de una celda a otra; de acuerdo a la ley de Beer una diferencia

cia del 1% en esta dimensión, provoca un cambio del 1% en la concentración estimada del problema; para obtener esta corrección, se elige una solución de sulfato de cobre --- acuoso, la cual se lee a una longitud de onda de 277 nm., obteniéndose así un sistema que sigue la ley de Beer; ade más se escoge el rango de absorbancia de 0.2 á 0.7 (re--- gión de error mínimo).

La absorbancia de esta solución se compara entre la obtenida en la "cubeta de referencia" y la medida en cada una de las cubetas por comprobar, la proporción que existe entre estos valores es igual a la que existe entre las longitudes del trayecto.

Como hemos mencionado, se pueden emplear a manera de cubetas, tubos de ensayo, siempre y cuando estén calibrados. Para efectuar la calibración se puede seguir el siguiente procedimiento:

- a). Decida la tolerancia permitida.
- b). Coloque el instrumento a una absorbancia de cero usando agua.
- c). Llene todos los tubos con una solución colorida (sulfato de cobre).
- d). Efectúe la lectura.

¿Cómo deben interpretarse los resultados?. Por ejemplo, si la absorbancia de la solución es de 0.50 y la tolerancia es de  $\pm 2\%$ , los tubos que tengan absorbancias -- dentro del rango 0.49-0.51 son aceptados.

Algunos de los tubos rechazados pueden ser aceptados

si se les coloca en una posición diferente dentro del aparato, es decir, si se les hace girar. Finalmente, debe marcarse el frente de cada tubo, para que siempre sea colocado en la misma posición.

Cuando se efectúe la lectura de una serie de problemas, incluyendo los patrones, se puede emplear una sola-cubeta, siempre y cuando una vez efectuada la primera lectura se escurra bien la solución sobre un papel absorbente y se enjuague la cubeta con la segunda solución, antes de hacer esta segunda lectura, y así sucesivamente.

Debido a que algunos disolventes son áltamente volátiles se recomienda emplear cubetas con tapón o efectuar la medición rápidamente, para evitar que la concentración se vea incrementada debido a la evaporación del disolvente (1, 2).

Cuidado de las Cubetas. Deben ser protegidas de --- cualquier tipo de contacto físico que produzca rayones - en su superficie externa; se debe evitar la reacción directa de substancias como el ácido sulfúrico concentrado-caliente y álcalis fuertes en la cubeta. Para efectuar la limpieza de estos dispositivos se recomienda el uso de detergentes suaves, sin utilizar para nada escobillones o cepillos que puedan dañar las superficies internas de las cubetas.

En aquellos casos en que la determinación exija el - empleo de substancias como las mencionadas en el párrafo-anterior, se recomienda hacer la lectura lo más rápidamente posible e inmediatamente enjuagar la cubeta (1).

### 5. Sistema Detector.

Para poder medir la energía electromagnética, ésta debe ser convertida a otro tipo de energía, a saber, energía eléctrica.

La medición de la energía radiante que emerge de la cubeta incluye varios pasos: detección, amplificación de la señal en caso de ser necesario y, presentación de datos.

Detección. Existen dos tipos de detectores que se emplean en las regiones visibles y ultravioleta:

- a). Celdas Fotovoltáicas. En este grupo encontramos las celdas semiconductoras o de capa barrera y los fotoresistores.
- b). Tubos fotoemisivos.

La elección del tipo de detector depende del poder radiante asequible.

Celdas Semiconductoras. Este tipo de detector consiste de una placa de cobre o fierro sobre la cual se deposita una capa semiconductor, formada por óxido cuproso, selenio o silicio. El semiconductor está recubierto por una capa de metal que transmite la luz y que funciona a manera de electrodo colector; la celda se deposita en una caja de vidrio o plástico para protegerla.

Al incidir un fotón sobre alguno de los átomos de selenio, por ejemplo, transfiere su energía a un electrón, el cual pasa al circuito externo y finalmente regresa a la celda.

Las celdas de selenio son más sensibles a los efectos de la temperatura y tienden a perder sensibilidad en los primeros cinco o diez minutos de operación, estabilizándose al alcanzar el equilibrio térmico. Cuando se cambia un filtro, se debe dar un período para que la celda se acostumbre a la nueva longitud de onda.

Si se prende el aparato cuando el filtro no está colocado, la celda se ciega y requiere de 30 minutos de descanso para funcionar adecuadamente.

Las celdas fotovoltaicas sufren los efectos llamados de fatiga, es decir, al ser iluminadas, la corriente se eleva rápidamente hasta un valor muy por encima del punto de equilibrio, y desciende gradualmente, por lo cual debe esperarse de 30 a 60 segundos antes de tomar la lectura.

La fotosensibilidad varía con la longitud de onda,--siendo máxima a 550 nm. para las celdas de selenio y decayendo un 10% del máximo a 250 y 750 nm.

Estas celdas son sensibles de la región ultravioleta hasta los 1200 nm. y no se requiere de una fuente de poder externa, puesto que este dispositivo se basa en transferencias internas de electrones para producir una corriente en el circuito externo.

Fotoresistores. Están formados por una banda de material que actúa a manera de resistencia y cuya acción disminuye bajo la influencia de la energía electromagnética. Se requiere de una fuente de poder externa, lo cual provoca que los instrumentos que los emplean como sistemas de detección sean electrónicamente más complejos.

Si el circuito está bien diseñado se puede lograr -- que la corriente que fluye a través del fotoresistor sea proporcional a la energía electromagnética que incide sobre él. Estos dispositivos poseen el mismo rango de sensibilidad que las celdas de capa barrera.

Fototubos. Contienen un cátodo recubierto con óxido de cesio, que emite electrones en forma proporcional a la energía radiante que incide en él, y un ánodo que colecta dichos electrones. En algunos casos, los fototubos contienen argón u otro gas inerte, pero en la mayoría de los instrumentos se encuentran al vacío.

Estos dispositivos tienen de 9 a 14 diodos que producen una corriente final, que puede ser  $10^8$  veces mayor -- que la corriente primaria.

Cuando un fotón incide en la capa de óxido de cesio -- transfiere su energía a un electrón, el cual en este estado excitado escapa de la superficie de dicha capa y es -- atraído por el ánodo. Después de ello, el electrón viaja a través del circuito externo, a manera de corriente eléctrica.

Los tubos que están totalmente protegidos de la energía radiante emiten una pequeña corriente anexa llamada -- "corriente oscura" (Una seria limitación a su sensibilidad) que es amplificada junto con la fotocorriente producida por la radiación incidente.

Como una regla sencilla para la elección del sistema detector se puede mencionar que el uso de filtros y monocromadores de baja dispersión proporciona la suficiente --

energía para poder emplear las celdas de capa barrera, y en aquellos casos en que se use un monocromador de alta-resolución, la elección adecuada son los tubos fotoemisores (1, 2, 3, 4, 10).

**Amplificación de la Señal.** La corriente que emerge de las celdas de capa barrera no es fácil de amplificar y por ello éstas se utilizan solamente en instrumentos de anchura de banda amplia, para la región visible, donde existe suficiente poder radiante para que un microgalvanómetro pueda acoplarse como instrumento de medición.

Otros diseños emplean dos celdas en un circuito de puente y un galvanómetro como indicador de punto nulo, para señalar que la salida por ambas celdas está balanceada. Las dos celdas son expuestas a la misma fuente de energía y la muestra se coloca entre la fuente y una de ellas. El circuito se balancea con el blanco y después se coloca la muestra (1).

**Presentación de Datos.** Esta puede efectuarse de varias maneras:

- 1). Una escala graduada en la cual puede leerse la absorbancia o la transmitancia.
- 2). Indicadores de punto nulo.
- 3). Indicadores digitales.
- 4). Impresión en papel (1, 2, 4).

Los medidores usados para presentar los datos en una escala graduada poseen algunas características interesantes y por ello explicaremos como funcionan:

Prácticamente todos los galvanómetros empleados en la actualidad son del tipo D'Arsonval de cuadro móvil o de cuadro que puede girar alrededor de un eje. En ellos el imán es grande y fijo, mientras que el elemento móvil es un cuadro ligero que puede oscilar en el campo del imán. El esquema de un galvanómetro de cuadro móvil está representado en la figura (5.1).

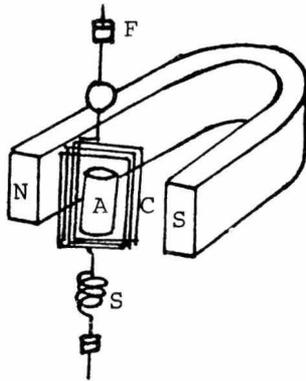


FIGURA 5.1 (9)

El campo magnético de un imán en herradura cuyos polos se designan por N y S se concentra en la proximidad del cuadro C mediante el cilindro de hierro A. El cuadro está formado por 10 ó 20 vueltas de hilo de cobre enrollado sobre un marco rectangular y suspendido mediante un hilo conductor, F, que proporciona un par recuperador cuando el cuadro se desvía de su equilibrio, y sirve también para hacer llegar la corriente al cuadro. El otro extremo del cuadro se conecta a una espiral, S, que sirve como segundo conductor.

Cuando se envía una corriente a través del cuadro, -

actúan fuerzas horizontales sobre sus lados verticales, - produciendo un par alrededor de un eje vertical que pasa por su centro. El cuadro gira en el sentido de este par y al cabo de cierto tiempo se detiene en una posición tal que el momento recuperador ejercido por la suspensión superior iguala al del par que hace desviar el cuadro. Se observa el ángulo desviado con ayuda de un haz luminoso - que se refleja sobre un espejo, M, sujeto a la suspensión superior, sirviendo este haz a manera de aguja indicadora (9).

Selección del Tipo de Instrumento. No existe un solo instrumento que sea ideal para todo tipo de aplicaciones y por ello los laboratorios que efectúan una amplia - variedad de análisis clínicos deben considerar los siguientes factores al hacer la selección del instrumento:

- a). Uso al que se le destinará. Si las determinaciones que se quiere hacer son las más comunes, es suficiente tener un fotómetro de filtro o un espectrofotómetro de baja dispersión; pero si se piensa efectuar determinaciones en el ultravioleta o mediciones con anchura de banda muy estrecha, se requiere de un instrumento más complejo. Los ensayos basados en técnicas cinéticas deben ser efectuados con instrumentos diseñados o modificados especialmente para este objetivo.
- b). Desempeño. Se deben comparar los siguientes parámetros: Rango fotométrico, estabilidad y resolución.
- c). Facilidad de Operación. El instrumento debe ser

lo más sencillo y fácil de usar, puesto que mientras más complejo sea su funcionamiento, mayor será el tiempo de adiestramiento para el operario, mayor tiempo se invertirá para efectuar la determinación y además se incrementa la posibilidad de error humano.

- d). Estabilidad. Muchos instrumentos son molestos - puesto que son inestables, lo cual requiere que frecuentemente se tenga que estar ajustando los controles o que se deba agregar un regulador de voltaje o una fuente electrónica de poder.
- e). Confiabilidad. Generalmente, mientras más componentes electrónicos y mecánicos posea un instrumento, aumenta la tendencia a sufrir errores. Si todos los demás factores son iguales, se debe escoger el instrumento que posea el diseño más sencillo.
- f). Costo. Debe tenerse en mente que el instrumento más caro no siempre es el mejor (1).

Aspectos Prácticos de la Fotometría y la Espectrofotometría. Todo instrumento debe ser revisado periódicamente y especialmente después de reemplazar alguna pieza, como filtro, fototubo y lámpara. En el caso de los espectrofotómetros se debe revisar la calibración de la longitud de onda y la transmitancia a varias longitudes de onda, además del funcionamiento general del instrumento (1).

Factores que Afectan la Longitud de Onda Nominal. La longitud de onda efectiva de un fotómetro de filtro se de

termina, en gran parte, por las características de transmisión del filtro; los otros factores son: distribución relativa de la fuente de energía y sensibilidad del detector en el rango espectral transmitido por el filtro.

El envejecimiento de la lámpara y del detector, o la sustitución de cualquiera de ellos, produce variaciones en la longitud de onda efectiva. Es de hacerse notar que el reemplazamiento de un filtro también provoca este tipo de alteraciones, puesto que a pesar de que tengan la misma clave, rara vez son efectivamente iguales.

Todos los filtros deben mantenerse limpios, lo cual puede lograrse con un pedazo de tela húmeda; se deben evitar los disolventes orgánicos pero si su uso es inevitable debe tenerse especial cuidado de que no entren en contacto con las orillas del filtro, puesto que puede disolverse el cementante (1).

Calibración de la Longitud de Onda. Para llevar a cabo esta calibración se han recomendado filtros de óxido de didymium o de holmium, aunque actualmente se usa el filtro y se comprueba mediante una solución ácida de sulfato de níquel, la cual tiene su pico de transmisión en los 510 nm. En el caso de que las lecturas obtenidas con el filtro y con dicha solución no sean congruentes unas con otras, puede emplearse una solución de cloruro de cobalto, la cual también tiene su pico de absorción en los 510 nm.

Los instrumentos de precisión requieren de una comprobación más exacta y para ello se usan bandas de emisión de lámparas de arco de mercurio o deuterio. La pri-

mera de estas lámparas es perfecta para efectuar calibraciones de longitud de onda en el rango de 205 a 1014 nm. y la segunda, en aparatos de ultravioleta, presentando líneas de emisión mayores en 486 y 656 nm. (1, 4).

Patrones de Transmitancia. Las lecturas de absorbancia varían de un instrumento a otro, a pesar de que ambos sean de la misma marca; la lectura en un mismo instrumento puede variar significativamente en un par de semanas.

Tales discrepancias no representan un problema cuando los resultados se calculan a partir de la absorbancia de un desconocido, en relación a la de un patrón.

La Oficina Nacional de Normas (National Bureau of Standards) ha publicado las características de transmisión de soluciones de sulfato de cobre, sulfato de cobalto y cromato de potasio, las cuales no han sido totalmente satisfactorias y se están ensayando nuevas soluciones-patrón.

Actualmente existen tres filtros de vidrio neutro, conocidos como SRM 930, los cuales son útiles para revisar el rango 400-700 nm. Es importante notar que aun con estos filtros grises, la transmitancia observada depende, en parte, de la superficie de los mismos, de su colocación y de la intensidad de la fuente luminosa.

¿Qué debe hacerse cuando la lectura de un espectrofotómetro es significativamente diferente del valor aceptado para el patrón de referencia?

De cuando en cuando debemos comprobar la calidad de las lecturas que obtenemos con este tipo de instrumentos,

y para ello hacemos uso de un patrón de referencia que -- tenga una absorción en la misma banda o bien en una banda cercana, por ejemplo: Sabemos que el NADH tiene su coefi- ciente de absorción molar específico ya se haga la lectu- ra a 325, 340 ó 366 nm.; si en un momento dado estamos -- trabajando a 340 nm. en la cuantificación de una enzima - que utiliza al NADH como cofactor, y deseamos saber si -- las lecturas que estamos obteniendo son las correctas, em- plearemos como patrón de referencia una solución de dicro- mato de potasio en  $H_2SO_4$  0.1 N con una concentración de - 50 mg./ml.; esta solución dará una lectura de 0.535, em- pleando una cubeta de 1 cm. de espesor y una longitud de onda de 350 nm., pero si hay algún desplazamiento podemos obtener una lectura diferente; para efectuar la correc- ción necesaria, se relacionan ambas lecturas con la de -- los problemas enzimáticos, de acuerdo a la fórmula siguien- te:

$$A_{340}/NADH \text{ corregida} = A_{340}/NADH \text{ observada} \times X$$

$$\frac{0.535}{A_{350}/K_2Cr_2O_7 \text{ observada}} \dots (5.4)$$

$$A_{350}/K_2Cr_2O_7 \text{ observada} \quad (1)$$

Blancos de Reactivo. Cuando se efectúa la determina- ción de un compuesto, se lleva a cabo una determinación - similar, pero empleando agua en substitución del proble- ma. Esto último es conocido como "blanco de reactivo" y- tiene como propósito determinar la absorción de la solu- ción, que no sea debida al compuesto en sí, si no a los - reactivos empleados.

Esta absorción puede presentarse por dos motivos:

- 1). Puede representar una contaminación de los reactivos con la sustancia por cuantificar, o la -- presencia de una o más sustancias capaces de -- reaccionar en forma similar.
- 2). Los reactivos, "per se", pueden ser coloridos, y aunque la reacción con la sustancia por determinar produzca un color diferente, ambos se sobreponen, por lo cual debe realizarse la corrección- para el blanco.

Si colocamos el aparato en absorbancia cero con agua, la lectura del desconocido es para éste más el reactivo.- Se lee el "blanco de reactivo" contra el agua y se hace-- la corrección para la absorbancia del problema, restando- la A del "blanco de reactivo" a la del desconocido; la resultante representa la absorbancia debida a la sustancia por determinar (1).

Luz Dispersada o Energía Perdida. No existe un método universalmente aprobado para determinar la cantidad de luz dispersada o energía perdida; debemos considerar que- puede ser de cualquier longitud de onda y aún puede ser - de una longitud de onda tal, que esté muy lejana de aque- lla seleccionada y por lo tanto no será absorbida por la- muestra.

Se pueden usar filtros de "corte preciso" para determinar la cantidad de luz perdida; estos filtros tienen la propiedad de detener toda la luz por arriba o por abajo - de un cierto rango.

El procedimiento a seguir es: Se coloca el selector

a la longitud de onda deseada y se ajusta el instrumento de manera que el medidor indique 100%T; se coloca un filtro y se anota la lectura del medidor, la cual es un índice de la luz perdida (1, 4).

Desviaciones de la Ley de Beer. Las desviaciones de esta ley son muy comunes, puesto que ésta es válida en un rango limitado y en las condiciones más cercanas a las -- ideales. Las causas que provocan las desviaciones pueden ser químicas o instrumentales. Entre las primeras tenemos:

- a). Formación variable de absorbente a partir del -- compuesto por determinar.
- b). Interacción del absorbente consigo mismo, es decir, formación de complejos o polimerización.
- c). Interacción del absorbente con el disolvente, -- por ejemplo, el yodo en un disolvente no polar -- como el tetracloruro de carbono, es de color morado, mientras que en disolventes polares, el color es café.
- d). Interacción del material absorbente con sustancias ajenas a la reacción.
- e). Cambio en el índice de refracción, con la concentración.
- f). Desplazamiento del equilibrio que involucre a -- los absorbentes, por ejemplo, cambios de pH o -- fuerza iónica, cuando éstos son ácidos o bases -- débiles.

Para hablar de los errores instrumentales, debemos--

considerar aquellas ocasiones en que la absorbancia de -- una solución se mide contra un blanco de alta absorban--- cia, casos estos en que las desviaciones a la ley de Beer suceden, a pesar de tener una anchura de banda estrecha.- Esto se debe a que a altas absorbancias, aún una pequeña-cantidad de luz desviada se torna una parte significativa de la radiación total que llega al detector. Tomando precauciones extremas para eliminar la luz desviada, se si-- gue la ley de Beer aún con valores de absorbancia eleva-- dos.

Afortunadamente la mayoría de las soluciones con las que se trabaja en química clínica presentan bandas de absorción lo suficientemente amplias de manera que el fil-- tro de banda ancha promedio es satisfactorio.

Por supuesto que las desviaciones a esta ley "per -- se" no significan que esta relación no sea útil, pero indica que tienen ciertas desventajas, a saber:

- a). Se incrementa el error fotométrico.
- b). Se debe construir una gráfica de calibración a - la cual debemos acudir en cada análisis, excepto cuando se trata de valores de concentración en - rangos limitados.

Como conclusión, el efecto de la luz dispersada en-- un fotómetro de filtro o un espectrofotómetro de baja dis-- persión es una seria limitación, especialmente para efec-- tuar mediciones a altas absorbancias.

Nunca se debe suponer que se cumplirá la ley de ---- Beer, sino que debe comprobarse en cada caso, bajo las --

condiciones del procedimiento empleado, para el rango de concentraciones que se encontrará en la práctica.

Una tercera causa para que la ley de Beer no se cumpla es el error humano, el cual puede aparecer en cualquiera de los pasos que deben seguirse para efectuar una determinación. Estos errores pueden cometerse al efectuar una medición volumétrica o gravimétrica, a no seguir la técnica seleccionada de la manera adecuada, a falta de limpieza del material empleado, etc. (1, 3, 8).

Precisión Fotométrica. Aún para un sistema que si-gue la Ley de Beer, el rango de concentraciones en el cual el análisis fotométrico es útil, está limitado por los valores bajos y los elevados. A altas concentraciones de material absorbente, la cantidad de energía radiante que pasa a través de la solución es tan pequeña que la sensibilidad del aparato no es suficiente para detectarla con precisión. A bajas concentraciones el error inherente en la lectura del galvanómetro o el dispositivo de lectura del resultado, es grande comparado con la cantidad que se mide. La deflexión del galvanómetro es directamente proporcional al poder de la radiación que incide en la fotocelda, lo cual significa que el cambio más pequeño y detectable del poder,  $\Delta P$ , será constante sin que se vea afectado por el valor absoluto del poder.

Para mayor precisión en la medición de la absorbancia  $A$ , el incremento  $\Delta A$ , que corresponde al cambio de poder  $\Delta P$ , debe ser una pequeña fracción de la absorbancia, es decir, la cantidad  $\Delta A/A$  debe ser mínima. Para determinar la transmitancia para la cual esta relación es -

mínima, es necesario diferenciar la ley de Beer dos veces e igualar la segunda diferencial a cero.

Escribamos la ley de la siguiente manera:

$$A = \log_{10} P_0 - \log_{10} P \dots (5.5)$$

Entonces,

$$dA = 0 - (\log_{10} e) \frac{1}{P} dP \dots (5.6)$$

De lo cual,

$$\frac{1}{A} dA = - \frac{0.4343}{A} \frac{1}{P} dP = - \frac{0.4343}{A} \frac{1}{P_0 10^{-A}} dP \dots (5.7)$$

Reemplazando las diferenciales por incrementos finitos tenemos:

$$\frac{\Delta A}{A} = - \frac{0.4343}{P_0} \Delta P \cdot \frac{1}{A 10^{-A}} \dots (5.8)$$

Diferenciando ( $\Delta P$  es una constante),

$$d \left( \frac{\Delta A}{A} \right) = - \frac{0.4343 \Delta P}{P_0} \frac{10^A \log_e 10}{A} - \frac{10^A}{A^2} dA \dots (5.9)$$

La condición para que el valor  $\Delta A/A$  sea mínima, es que el miembro derecho de la ecuación anterior sea cero, lo cual significa que el factor que está entre paréntesis debe ser cero, o sea:

$$\frac{10^A \log_e 10}{A} = \frac{10^A}{A^2} \dots (5.10)$$

de lo cual,

$$A = \frac{1}{10g_e \cdot 10} = 0.4343 \dots (5.11)$$

Esto significa que el valor óptimo para la absorbancia es de 0.4343, lo cual corresponde a una transmitancia de 36.8%.

Un método ventajoso para graficar es el de %T contra el logaritmo de la concentración. Si se cubre un rango-- amplio de concentraciones se obtiene una curva de Rinbgom (en forma de S); si el sistema sigue la ley de Beer, el punto de inflexión se encuentra a un valor de transmitancia de 37. (3, 4).

Gráficas de Espectro de Absorción. Estas relacionan la A o %T con la longitud de onda, y son útiles para seleccionar la longitud de onda adecuada para efectuar mediciones cuantitativas o para identificar a la molécula absorbente.

Lo más común, para presentar los datos de absorción, es graficar la A contra la longitud de onda, en papel milimétrico, registrando en las ordenadas las lecturas y en las abscisas la longitud de onda (1).

A manera de ejemplo presentamos la gráfica de absorción del NAD y del NADH:

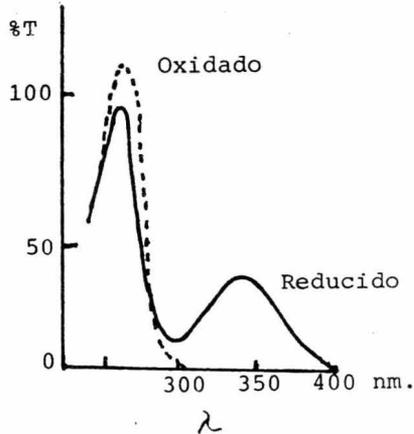


FIG. 5.2 (7)

La reducción enzimática del NAD y del NADP está acompañada de tres cambios característicos, los cuales son -- útiles para medir el curso de la reacción. En su forma oxidada, estas coenzimas no muestran absorción en el rango del visible a no ser por un pico intenso alrededor de los 260 nm., el cual surge debido al anillo de la adenina. Cuando éstas se reducen, aparece una banda de absorción en los 340 nm. y decrece la cantidad de luz absorbida a 260 nm.

De esta gráfica podemos concluir que si se desea medir NADH o NADPH, debe hacerse a 340 nm. y si se desea medir NAD o NADP, usaremos una longitud de onda de 260 nm.- (7)

Elección de la Longitud de Onda. Para efectuar trabajos cuantitativos debe elegirse aquella longitud de on-

da a la cual la sustancia posee un pico de absorción máximo. Si este pico se encuentra fuera del límite espectral del aparato, o es tan intenso que no puede medirse, se debe trabajar a otra longitud de onda cercana al pico máximo o a aquella a la cual presente otro pico de absorción si es el caso.

Otros factores importantes al elegir la longitud de onda son:

- a). Al adaptar métodos diseñados para colorimetría visual a métodos fotométricos, se ha encontrado que si se sigue la regla general que hemos citado, el rango de trabajo se restringe. Para extender este rango se debe seleccionar otra longitud de onda, a pesar de que se sacrifique la sensibilidad y aún la precisión fotométrica.
- b). Es deseable tener una absorción elevada debida a la sustancia que se quiere determinar, en relación con la absorción debida a otras sustancias presentes.
- c). Otros factores que pueden, ocasionalmente, influir en el criterio de selección son la amplitud de banda que se puede obtener a diferentes longitudes de onda, y el error instrumental, los cuales tienden a aumentar en la región en que el fotoreceptor es menos sensible (1,8).

Gráficas de Calibración. Relacionan  $A$  o  $\%T$  con la concentración. Cuando es posible, conviene efectuar una gráfica de calibración que abarque el rango completo de --

concentraciones que pueden encontrarse en la práctica, lo cual es el primer paso que debe darse al utilizar un procedimiento fotométrico.

La concentración puede expresarse en un gran número de formas (mg./100 ml., molaridad, etc.) pero la forma -- más conveniente es emplear las mismas unidades en que se reportó el resultado final.

Usualmente es satisfactorio graficar %T contra concentración; para determinar si la relación entre A y la concentración es lineal, se requiere de un mínimo de tres puntos. Una A igual a cero, corresponde a una concentración de cero, con lo cual inmediatamente tenemos localizado un punto, lo cual significa que además de un "blanco de reactivo" se deben determinar como mínimo un par de -- puntos, uno de los cuales debe representar la concentración más alta del rango que se espera encontrar en la --- práctica, y la otra lectura debe representar la mitad de dicha concentración.

Los puntos experimentales no deben obtenerse corriendo la concentración más alta y efectuando diluciones seriadas de la solución colorida final; cada punto experimental debe obtenerse independientemente.

Como existe un error experimental relacionado con cada punto que se determina, se debe pensar que es rara la ocasión en que se puede obtener una recta que pase por todos los puntos, por lo cual se deben considerar aquellos puntos que formen la recta que mejor los represente, y si alguno o algunos se desvían en forma notable debe repetir se dicha gráfica.

Las indicaciones que citamos para la construcción de una recta solo son aplicables para aquellos datos para -- los cuales este tipo de gráfica es justificable, tomando-- en consideración el grado de error involucrado, si hay -- una ligera desviación de la recta dibujada.

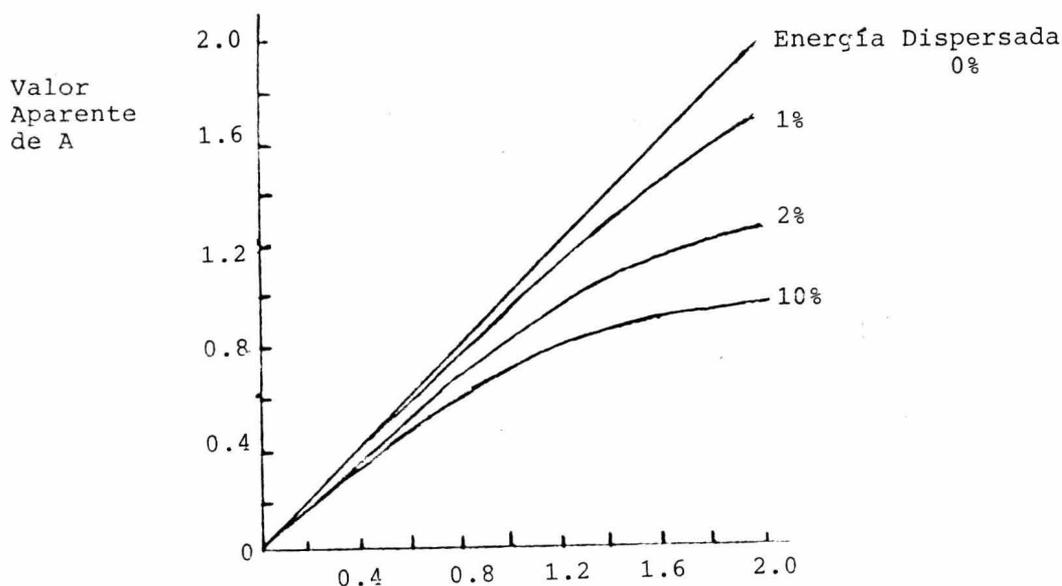
Si es obvio que una recta no representa los datos, -- se debe dibujar una curva, lo cual requerirá la determina-- ción de más puntos. La concentración de los problemas -- puede leerse directamente de la gráfica de calibración.

Para propósitos prácticos, puede considerarse un pe-- queño segmento de la curva, como una línea recta. La con-- centración de un desconocido puede calcularse a partir de dos patrones cercanos al problema, si aceptamos que la -- ley de Beer es válida para este segmento; la distancia -- permisible entre los patrones y el problema depende del-- grado de curvatura y del grado de error permisible en el-- resultado (1).

Efecto de la Luz Dispersada. Este término se aplica a la energía radiante indeseable que surge como consecuen-- cia del polvo, hendiduras u otras imperfecciones ópticas-- en los prismas o cubetas.

El efecto de la luz dispersada sobre los valores de la absorbancia se muestra en la figura 5.3, donde los va-- lores aparentes de A se han calculado para los valores -- reales de la misma, en circunstancias en las cuales el -- 0%, 1%, 5% y 10% de la energía incidente no es absorbible.

FIG. 5.3 (1)



A medida que la cantidad de energía dispersada aumenta, la desviación de una relación lineal se incrementa. - Para las tres condiciones (1%, 5% y 10%), a medida que el valor real de A se aproxima al infinito (la concentración se aproxima al infinito), los valores aparentes de A se aproximan a 2, 1.3 y 1 respectivamente.

Esta es una de las consecuencias más serias producidas por la energía dispersada, es decir, que la exactitud decrece a altas concentraciones (1).

Errores Fotométricos que se Originan en el Instrumento. Algunos de éstos no son de consecuencia para el tra-

bajo cuantitativo ordinario ya que se eliminan con el uso de gráficas de calibración, las cuales deben ser revisadas con regularidad. Los errores de esta categoría incluyen aquellos debidos a mediciones efectuadas con luz no monocromática, empleo de cubetas cilíndricas, reflexiones en las superficies de las mismas y la luz dispersada que llega al detector.

Otra categoría de errores se relaciona a las técnicas empleadas al hacer la medición; los errores debidos a cubetas sucias o rayadas pueden evitarse siendo cuidadoso.

Asumiendo que la ley de Beer se aplica, el error relativo en la medición de la concentración ( $\Delta C/C$ ) depende del error al medir el poder radiante ( $\Delta P$ ), y la absorbancia observada ( $A$ ), como sigue:

$$\frac{\Delta C}{C} = - \frac{P}{2.3 AP} \dots\dots (5.12)$$

En aquellos instrumentos en que la fotocorriente es medida con un galvanómetro o un potenciómetro con escalas lineales, la incertidumbre al efectuar la lectura es el factor limitante. En tales casos  $\Delta P$  es independiente de  $P$  y el error fotométrico es mínimo a 37%T (0.43 A). Esta limitación es la base del error de curva de Twyman-Lothian.

En los instrumentos que emplean fototubos, amplificación electrónica y dispositivos de lectura modernos, el error al medir el poder radiante tiende a ser proporcional a la raíz cuadrada del mismo. Bajo tales circunstancias, el error fotométrico es mínimo en 13%T (0.87 A).

La curva tiene un amplio mínimo en ambos casos, pero se incrementa fuertemente fuera del rango 0.5 M á 2 M, -- donde M es la absorbancia correspondiente al error mínimo. Para los instrumentos antiguos el rango óptimo es de 20%T á 50%T (0.7 á 0.2 A) y es más amplio para los aparatos modernos.

Un error común consiste en no reconocer que ocurren errores progresivamente mayores a medida que las lecturas de absorbancia se desvían del rango óptimo. Las mediciones deben limitarse al rango 10%-80%T (1.0-0.1 A) a menos que se sepa que el instrumento funciona satisfactoriamente en un rango más amplio.

Existen varias maneras de llevar el %T al rango óptimo: a) Ajuste de la concentración mediante el uso de una alícuota mayor o menor de la muestra. b) Usar cubetas de diferente longitud de trayecto (trayecto corto para un %T bajo y trayecto largo para un %T elevado). c) Usar una longitud de onda o filtro diferente. d) Lectura del desconocido contra un estándar.

**Precaución:** Normalmente no es satisfactorio el diluir la solución final, excepto cuando el diluyente tiene la misma composición que el estándar cero, debido a cambios químicos que ocurren en la mezcla de reacción (1).

Errores Fotométricos que se originan en la muestra:

Existen cuatro fuentes de error que se originan en la muestra propiamente dicha, a saber, temperatura, tiempo, turbidez y fluorescencia.

Efectos Térmicos. La variación en la temperatura -- puede afectar la medición ya sea cambiando el volumen del disolvente (alrededor de 0.1 a 0.2%/grado centígrado) o por cambios físico-químicos, tales como el grado de asociación o disociación o la solubilidad, o raras, veces, - cambiando la absortividad molar.

La exposición a la radiación ultravioleta puede producir cambios fotoquímicos en el disolvente y por tanto-- cambia las características de absorción.

Las principales causas de variaciones de temperatura significantes son: calentamiento excesivo de la muestra-- por la fuente de radiación, no permitir que una muestra-- fría o caliente adquiriera la temperatura ambiente antes de efectuar la medición y amplias fluctuaciones de la temperatura ambiental.

Existen, para algunos instrumentos, equipos adicionales para controlar la temperatura y éstos son indispensables para determinaciones cinéticas.

Tiempo. Muchas de las soluciones que se utilizan en la química clínica tienen propiedades de color inestables, es decir, la intensidad del color puede disminuir o aumentar. Las mediciones de estos sistemas deben realizarse a un intervalo de tiempo estándar después de que se ha iniciado la reacción productora del color.

Cuando se hacen curvas de absorción de soluciones de estabilidad desconocida, es necesario establecer su validez rectificando puntos intermitentes de vez en cuando -- (1).

Turbidez. Las partículas en suspensión, frecuentemente de naturaleza coloidal, producen un decremento en la energía radiante transmitida debido a una combinación de absorción real y dispersión. Como la dispersión es mayor a menor longitud de onda, la presencia apreciable de turbidez también produce una desviación en los picos de absorción.

Debe convertirse en una rutina el examinar las soluciones antes de colocarlas en el instrumento, aunque el aparato puede detectar turbidez que no es fácilmente visible.

Algunas ocasiones la solución puede aclararse filtrándola o centrifugándola, pero otras veces no es posible, por lo cual debe corregirse esta absorción usando una gráfica de  $\log. A$  contra  $\log. \lambda$ , puesto que esta relación es lineal para partículas incoloras (1).

Fluorescencia. En la mayoría de los instrumentos la cubeta se coloca delante del detector y después del filtro o monocromador, lo cual es deseable para reducir el calentamiento pero origina un error fotométrico cuando existe fluorescencia por parte de la muestra o la cubeta. Por ejemplo, si una longitud de onda de 380 nm. produce la emisión de fluorescencia de cualquier longitud de onda, la energía radiante de ésta se suma a la transmitida-

por la muestra.

Solo una parte de la fluorescencia llega al detector debido a que ésta es transmitida proporcionalmente en todas direcciones, razón por la cual el error debido a ella rara vez es grande. En los instrumentos en que la cubeta se coloca entre la fuente y el filtro o monocromador, el error es despreciable (1).

## VII. FLAMOMETROS

### INTRODUCCION

La mayoría de los elementos inorgánicos localizados al principio de la tabla periódica no absorben luz en las regiones útiles del espectro, bajo condiciones normales. Existen excepciones como el cobre y el cromo, pero aquellos de gran importancia en sistemas fisiológicos, como el sodio, potasio y magnesio no pueden ser determinados por los procedimientos fotométricos simples, puesto que no es fácil separar uno de otro y/o no forman complejos coloridos.

Se ha demostrado que estos elementos al ser fuertemente energizados emiten y absorben longitudes de onda características a cada uno de ellos.

La flamometría es la medición de la concentración de un material iónico en una solución que es introducida a una flama, donde la intensidad de la luz emitida por la misma es medida (8).

### PRINCIPIOS

La flamometría o fotometría de flama puede dividirse en tres categorías: a) Emisión atómica, b) Absorción atómica y c) Fluorescencia atómica.

En todos los casos, la flama sirve para convertir el elemento que es medido a un vapor atómico. Después, las transformaciones reversibles entre el estado excitado y el estado basal, originan la señal óptica que es medida-- (1, 2).

Debido a la gran cantidad de energía disponible en un sistema de alta temperatura, los átomos del material introducido a la flama pueden adquirir diferentes niveles de excitación. Una cierta cantidad o cuanto de energía térmica es absorbida por un electrón, permitiéndole así ocupar una órbita más energética pero menos estable.

Como esta órbita es menos estable, el electrón retorna casi instantáneamente a su estado basal y emite una serie de longitudes de onda a lo largo de una escala espectral amplia, en lugar de emitir una sólo longitud de onda.

Este fenómeno puede representarse como  $A^* \xrightarrow{\quad} A + h\nu$ , donde  $A^*$  representa un átomo excitado,  $A$  un átomo en estado basal y  $h\nu$  un fotón.

En la flamometría convencional (emisión atómica), los átomos excitados son generados por el calor y las reacciones químicas que ocurren en la flama, siendo la reacción que origina la señal óptica de izquierda a derecha. La instrumentación está diseñada para medir los fotones emitidos y de ahí el nombre de emisión atómica.

En la absorción atómica la reacción es de derecha a izquierda. Un rayo de luz monocromática de frecuencia se pasa a través de la flama y se hace una medición de la

atenuación resultante de la interacción entre los fotones y los átomos en estado basal, para producir átomos excitados.

La flamometría de fluorescencia atómica es un método que está emergiendo y aún no tiene aplicación en la química clínica. En este método los átomos excitados se producen iluminando la flama con un rayo de luz muy intenso y los fotones que son emitidos cuando los átomos regresan al estado basal, son medidos. Esta medición se efectúa a ángulos rectos con respecto al rayo excitante, como en la fluorometría.

En la flamometría el fluido biológico diluido se atomiza en la flama, sin ninguna separación previa. Las emisiones resultantes son aquellas pertenecientes a todos -- los iones inorgánicos presentes.

Para efectuar la medición, la luz emitida por los iones inorgánicos, pasa a través de un monocromador en donde se selecciona la longitud de onda más característica del elemento por analizar, que será aquella que permita aplicar la ley de Beer.

Es de hacerse notar que sólo alrededor del 1% de los átomos presentes en la flama sufren el proceso descrito anteriormente, esto, aunado a la relativamente baja intensidad de emisión de la mayoría de los elementos, limita las aplicaciones biológicas de la técnica. El sodio y el potasio son los únicos elementos con la suficiente intensidad para ser medidos fácilmente (1).

## COMPONENTES BASICOS DE UN FLAMOMETRO

La mayoría de los flamómetros de emisión atómica usa dos en la química clínica son específicamente diseñados - para determinar sodio y potasio en suero y orina y tien-- den a usar diseños ópticos sencillos. Los instrumentos - de absorción atómica son más complejos debido, a que debe incluirse una fuente de radiación.

Los componentes básicos son: atomizador, quemador -- con provisión de gas y reguladores, monocromador y detec-- tor.

Combustible. El gas natural o el propano son los -- combustibles comunes para la emisión atómica y el acetileno para la absorción atómica. Las temperaturas obtenidas varían de los 1200 a los 3000°C., aunque usando cianógeno y oxígeno se obtienen temperaturas de 5000°C., sin embar-- go, en este último caso los productos de la combustión -- son tóxicos y potencialmente dañinos (4).

Reguladores de Presión. Para tener un error instru-- mental mínimo, se requiere una flama constante que libere una cantidad de calor también constante. Todo esto depende de la presión de aire u oxígeno y gas (4).

Flama. Las flamas pueden clasificarse como suaves o duras. Las flamas duras son pequeñas y de alta energía - térmica, mientras que las suaves son largas y de menor -- temperatura.

Flamas Duras. Para obtener éstas, se usa oxígeno -- combinado con hidrógeno, acetileno o propano y son muy esu

tables. Las altas temperaturas que se obtienen con estas flamas permiten que algunos elementos cuya intensidad de emisión es baja, sean medidos adecuadamente, como ejemplo se tiene el calcio.

Flamas Suaves. En este caso se usa aire comprimido y propano o gas natural y las flamas son menos estables - (2).

Quemador y Atomizador. Tanto en los instrumentos de emisión como en los de absorción, la solución debe ser -- convertida en un fino aerosol antes de ser introducida a la flama. Este proceso recibe el nombre de nebulización y el nebulizador o atomizador se considera como parte del quemador.

En la flama, el disolvente se evapora y deja peque-- ñas partículas que se desintegran en átomos bajo la in--- fluencia del calor; este fenómeno recibe el nombre de ato mización.

En otro tipo de quemador, la solución es aspirada di rectamente a la flama, se creía que así se obtendría ma-- yor sensibilidad puesto que no habría pérdida de la solu ción debida a la nebulización, pero ahora se sabe que con este método una parte importante de la solución pasa por la flama sin sufrir ninguna alteración y además las partí culas son grandes, por lo que la conversión a átomos es-- menos eficiente.

Otras desventajas consisten en que la flama se torna turbulenta y este produce concentraciones variables de -- átomos tanto en estado basal como excitado, provocando --

que la señal sea inestable (1, 2, 4).

Sistemas Ópticos de los Instrumentos de Emisión Atómica. La mayoría de estos flamómetros emplean un filtro para seleccionar la región espectral deseada y una lente para enfocar una imagen de la flama sobre el detector. En caso de requerirse una mejor resolución, se emplean monocromadores como los usados en los espectrofotómetros (1, 4).

Detectores. La medición de la intensidad de emisión se puede efectuar de dos maneras. En el primer método se usa un tubo fotomultiplicador, el cual convierte la luz incidente a energía eléctrica por medio de cátodos múltiples, en un efecto de cascada.

En el segundo método se usa una fotocelda de capa de barrera (fotovoltaica) que consiste de una capa de metalcubierta por un compuesto como el sulfato de cadmio. La luz incidente golpea el compuesto de cadmio y se genera un flujo de electrones entre las dos capas.

En ambos casos, la corriente generada llega a un medidor para su lectura directa, o es amplificada y presentada en forma digital o impresa en una tira de papel.

En los flamómetros de emisión más simples, la luz emitida incide sobre una fotocelda y la señal electrónica resultante pasa directamente a un galvanómetro.

Para calcular la concentración del problema se debe comparar la señal obtenida, con aquella resultante de correr una serie de soluciones tipo. Cuando se usa un pa--



trón interno es necesario encontrar la proporción que --- existe entre las señales del desconocido y las del patrón interno para compararla con la proporción obtenida para - las soluciones tipo (1,4).

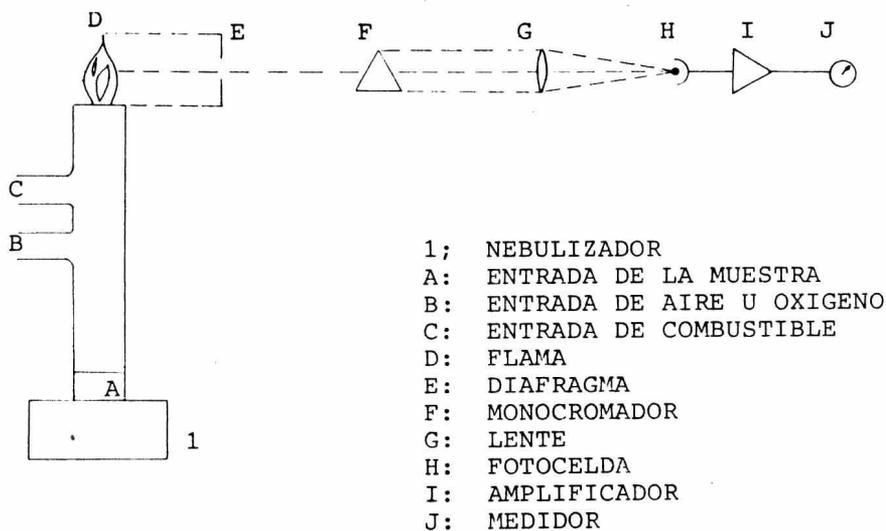


FIG. 6.1 FLAMOMETRO DE EMISION.

## MANEJO Y CUIDADOS.

El flamómetro es capaz de comparar la señal producida por la solución problema con la producida por los patrones, por lo cual es importante que éstos sean confiables y que las diluciones que sea necesario hacer sean precisas.

Antes de hacer lecturas en el aparato, se debe darle un tiempo de calentamiento de unos cuantos minutos. Para efectuar este calentamiento se introduce una solución preparada a las que se van a determinar.

Es adecuado incluir un patrón "cero" para usarlo en el ajuste del cero y el cual debe compararse contra el disolvente puro para determinar el blanco.

Con los instrumentos que usan el patrón interno, es necesario usar un método independiente para determinar el blanco proporcionado por el mismo. Finalmente, leyendo el estándar "cero" contra el patrón interno diluido con disolvente puro se obtiene una medida del blanco proporcionado por ingredientes que no son el patrón interno o el disolvente.

La pregunta que no ha tenido una respuesta unánime es: ¿Cuántas soluciones tipo deben correrse?.

Existen muchas recomendaciones para contestar la pregunta anterior, una de ellas es: Usar tres patrones que abarquen la escala de valores encontrado en la práctica.

Otra manera de hacerlo consiste en correr una serie completa de distintas concentraciones patrón antes y después

de leer los problemas.

Una gráfica de lecturas de los patrones contra su -- concentración, da la curva de calibración, a partir de la cual se pueden obtener las concentraciones de los problemas. También se puede calcular directamente cuando el -- problema cae muy cerca de uno de los patrones.

El suero y la orina deben diluirse para evitar que - ocurra un taponamiento del nebulizador y el atomizador. - La composición del diluyente depende de: a) el elemento que se va a determinar, b) la necesidad de incluir sustancias para evitar interferencias, c) el tipo de instrumento (de absorción o emisión) y d) si es de lectura directa o usa un patrón interno.

Para el Na en suero, la dilución puede ser de 1:50 a 1:500; para el K en suero va de 1:10 a 1:100, aunque comúnmente se usa 1:50 para ambos elementos. Cuando se trata de determinar estos elementos en orina, se empieza con dos diluciones, porque hay una mayor variación en la concentración de ellos en orina que en sangre.

El factor de dilución se determina considerando los sólidos totales presentes en la muestra, la sensibilidad del instrumento, la relación entre señal y concentración y la cantidad de muestra disponible.

Para detectar interferencias se hace una serie de diluciones en las proporciones 1, 2, 4..., etc. y se determina la proporción que existe entre las señales del problema y el patrón en cada dilución. Esta proporción será constante si no hay interferencias.

Se requiere que el material volumétrico de vidrio es té perfectamente calibrado. Las soluciones deben estar bien mezcladas y el agua destilada estará libre de contaminantes que puedan interferir las determinaciones. Para lo cual debe purificarse por medio de columnas de intercambio iónico, por destilación, o por ambos procedimientos.

Las botellas para almacenar las soluciones deben ser de polietileno, vidrio Pyrex o cualquier otro material -- que no introduzca contaminantes. Antes de usar las botellas de vidrio, deberán permanecer llenas de agua destilada con HCl durante varios días y después enjuagarse con agua destilada.

Cuando se usa acetileno como combustible se debe tener cuidado de que no esté contaminado con fosfina, puesto que este compuesto imparte un color verdoso a la flama, lo cual interfiere con la medición (1, 3, 4).

#### METODO DEL PATRON INTERNO

Las diferentes cantidades de solución que llegan a la flama, el funcionamiento del atomizador, el grado de eficiencia de formación de átomos y variaciones de la flama producen variaciones en la lectura. Esto se puede com pensar parcialmente usando la técnica del patrón interno, que consiste en que un elemento ajeno a la muestra que se analiza, pero teniendo características similares a las -- del elemento que se determina, se agrega en una concentra ción conocida.

Para Na y K se usa el Li; primeramente se diluye el-

suero o la orina y el litio se incorpora en el diluyente.

Los cálculos involucran la comparación de la proporción de las señales de Na a Li y de K a Li entre el problema y los patrones.

Es importante seguir estas indicaciones:

1. La concentración del patrón interno debe ser conocida con toda exactitud. El compuesto usado debe ser puro.

2. El patrón debe tener propiedades físicas y químicas similares a las del problema.

3. Los potenciales de excitación del patrón y del elemento a determinar deben ser cercanos.

4. Las líneas de emisión de ambos no deben ser cercanas puesto que ello puede provocar interferencias.

5. La concentración del patrón debe ser del mismo orden de magnitud que la del problema.

6. El elemento usado como patrón no debe encontrarse cantidades significativas en la solución que se está analizando (1, 2, 3, 4).

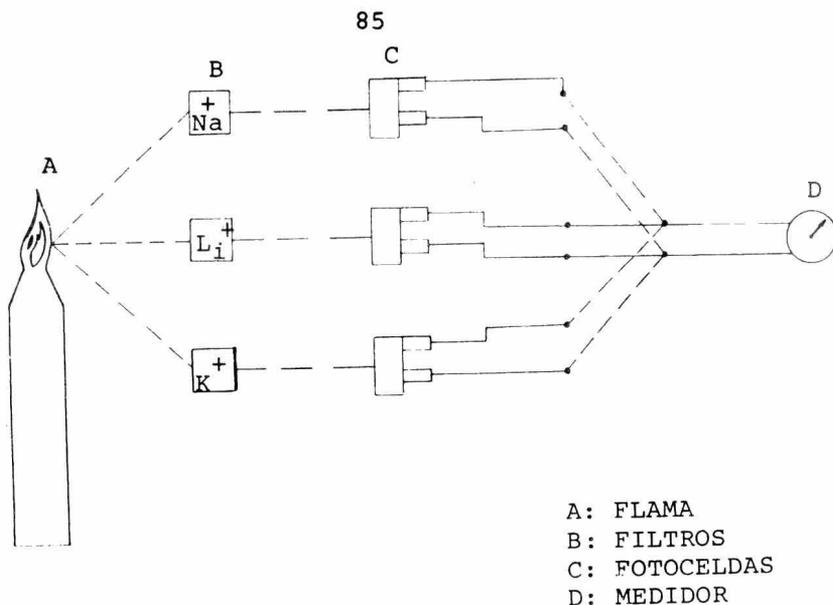


FIG. 6.2 FLAMOMETRO DE CANALES MULTIPLES

Fuentes de Error. Puede decirse que los errores surgen de: a) El instrumento usado, b) Substancias presentes en la muestra o en los reactivos y c) Técnicas inadecuadas o mal efectuadas.

En lo que respecta al sistema quemador, es esencial tener una flama estable que provea una temperatura constante, lo cual se logra controlando la presión del combustible y los gases oxidantes.

Se debe vigilar el flujo de gas como una precaución contra las obstrucciones que puedan haber tanto en el atomizador como en el quemador. Cuando se usa aire comprimido es necesario filtrarlo para eliminar las partículas -- que pueda contener.

El gas comercial varía en composición y además es difícil de regular puesto que las presiones son bajas y variables. En caso de usar acetileno, debe cambiarse el --tanque antes de que se vacíe totalmente, puesto que las -porciones finales contienen una cantidad apreciable de disolvente.

Otro punto importante consiste en tener las presio--nes adecuadas para el oxidante y el combustible y la proporción correcta entre ambos, debido a que si no se cum--ple con este requisito se tiene una pérdida de sensibili--dad.

Los últimos requerimientos son: que la nebulización sea constante y tener en cuenta que la viscosidad, densidad, presión de vapor, tensión superficial, temperatura, -composición del disolvente, contenido de sales y cambios- en el tamaño del aerosol debidos a obstrucción por protefinas u otras sustancias, son factores que producen un comportamiento variable de muestra a muestra o entre patro--nes y problemas.

Para evitar las obstrucciones se debe revisar y lim--piar el nebulizador a intervalos regulares.

La interferencia química es otro problema que debe -considerarse; la presencia de ciertos aniones en la mues--tra produce la formación de compuestos que se disocian de una forma parcial al estar en la flama, lo cual abate la--señal.

Como ejemplo del caso anterior, podemos citar que --los fosfatos interfieren en la determinación del calcio;-

el efecto de estos aniones puede superarse añadiendo lantano o estroncio, debido a que el fosfato de lantano -- precipita al evaporarse el disolvente.

También pueden usarse agentes quelantes para eliminar la interferencia química y entre estos se encuentran el EDTA, ácido cítrico y el glicerol, o incrementar la -- temperatura de la flama.

Interferencia por ionización. El equilibrio que --- existe entre átomos, iones y electrones en una flama puede representarse como:  $M^0 \rightleftharpoons M^+ + e$ . La señal fotométrica es proporcional al número de átomos libres ( $M^0$ ) y cualquier incremento en electrones libres ( $e$ ) aumentará la señal debido a que el equilibrio se desplaza hacia la derecha. Para que el efecto sea significativo el elemento a analizar debe estar considerablemente ionizado; la ionización es dependiente de la temperatura y debido a las bajas temperaturas que se usan en la química clínica éstas -- es de 3% para el K y 0.3% para el Na.

En la práctica, la interferencia por ionización para el Na y K es muy pequeña pero con otros elementos o con -- altas temperaturas, el efecto debido a una ionización variable puede ser significativo. Esto puede controlarse -- agregando a la solución problema un exceso de un elemento fácilmente ionizable que estabilice la flama proveyendo -- una alta concentración de electrones libres (1, 4).

#### FLAMOMETRIA DE ABSORCION

Todos los elementos tienen la capacidad de absorber radiación electromagnética, a la misma longitud de onda a

la cual emiten; esta es la base de la flamometría de absorción.

Si aplicamos energía (térmica, eléctrica o electromagnética) a un átomo, los electrones pueden pasar a una órbita de mayor energía. Esto es lo que ocurre en esta metodología; un átomo en el estado basal, donde posee menor energía, absorbe energía y esto fuerza a un electrón a pasar a un nivel energético mayor, dando por resultado un átomo excitado.

Usamos el átomo de hidrógeno como ejemplo: Al absorber energía los electrones pasan a órbitas más energéticas; a medida que el electrón retorna a su órbita original, emite radiación en líneas específicas. El paso de un electrón del estado basal a la órbita siguiente requiere la menor cantidad de energía. Recordemos que: - - -  $E = h\nu$  y  $\nu = c/\lambda$ . Por lo tanto, la longitud de onda absorbida al excitarse un átomo es la más grande del espectro y es llamada línea de resonancia.

La absorción atómica consiste de tres pasos:

1. La muestra es convertida a un vapor atómica, usualmente por una flama.
2. El vapor atómico es irradiado a una longitud de onda característica del elemento que se trata de determinar.
3. La absorción de la luz por la muestra vaporizada está relacionada con la concentración del elemento presente en ella.

El grado de absorción ( $d\nu$ ) sigue la relación:

$$\Sigma K \nu d \nu = (\pi e^2 / mc) N f$$

donde:

$K$  = coeficiente de absorción a la frecuencia  $\nu$  .

$e$  = carga del electrón

$m$  = masa del electrón

$c$  = velocidad de la luz

$N$  = número de átomos en estado basal

$f$  = fuerza osciladora de la línea de absorción

$K$ ,  $e$ ,  $m$ ,  $c$  y  $f$  son constantes para un elemento dado; la única variable es  $N$ .

La intensidad de la línea de emisión en la flamometría es proporcional al número de átomos excitados, pero éste a su vez es función de la longitud de onda de emisión y de la temperatura del sistema. Una ventaja de la absorción atómica es que existen muchos más átomos en el estado basal que en el excitado. La ley de Lambert y Beer no tiene aplicación en la absorción atómica y esto es debido a que los átomos no se encuentran en una distribución homogénea, es decir, la muestra va de moléculas a átomos en estado basal y a óxidos.

Por lo expuesto anteriormente, no se pueden encontrar valores para  $b$  y  $c$ , además con esta técnica no se requieren, puesto que las muestras y los patrones se corren al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, cancelando así todos los valores excepto  $K$  (concentración).

Enumerando las ventajas de la flamometría de absorción sobre la de emisión:

1. Una mayor cantidad de átomos están disponibles para absorber, debido a que la mayoría de ellos se encuentran en estado basal.

2. Las interferencias por variaciones de temperatura y longitud de onda son ligeras, mientras que en la emisión son importantes.

3. La proporción entre luz incidente y luz transmitida puede usarse para medir la absorción, mientras que en la emisión se debe determinar la intensidad absoluta de la luz emitida (4).

#### INSTRUMENTACION

Los componentes del equipo de absorción son: una fuente de radiación, porta-muestras, monocromador y detector.

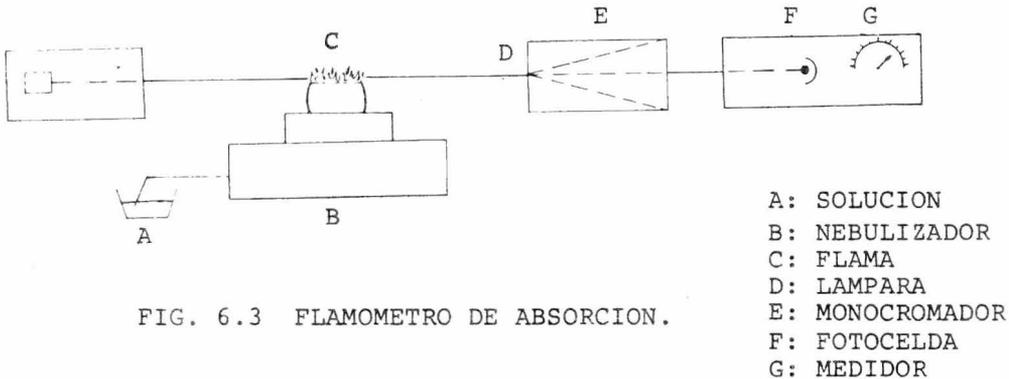


FIG. 6.3 FLAMOMETRO DE ABSORCION.

1. Fuente de radiación. Se usa una lámpara de cátodo - vacío o hueco en la cual el cátodo está construido del -- elemento a determinar.

Esta lámpara se llena con un gas monoatómica como el neón o el argón. Cuando se aplica un voltaje, el gas se carga y bombardea los átomos de metal del filamento catódico, lo cual provoca que los átomos metálicos excitados sean liberados a la atmósfera de la lámpara. Al retornar estos átomos a su estado basal, liberan luz de longitudes de onda características, es decir, emiten un fotón de --- energía  $h\nu$  la cual es la energía exacta que absorben los átomos metálicos presentes en la muestra.

Existen también las llamadas lámparas de cátodo vacío de alta intensidad, las cuales contienen dos electrodos extras, los cuales están cubiertos por un material -- fácilmente excitable. Una corriente directa fluye entre estos dos cátodos auxiliares, provocando que se ionizen-- más átomos del gas, lo cual a su vez provoca que se incremente el número de átomos excitados.

Para la determinación de Na, K, Cs y Rb se usa la -- lámpara de descarga de vapor, la cual está llena de un vapor parcialmente constituido por el elemento de interés. Al pasar una corriente a través del vapor se efectúa la - emisión (1, 4).

2. Quemador. El atomizador y la flama toman la muestra y reducen el metal que se quiere determinar, de ión o molécula a átomo en estado basal.

Los quemadores pueden ser: a) Quemador de consumo -

total, en el cual toda la muestra es inyectada a la flama, y b) Quemador lundegardh.

Las ventajas del primero son:

1. Es relativamente fácil de limpiar
2. Tiene una respuesta rápida.

Sus desventajas son:

1. La viscosidad de la muestra afecta la velocidad de aspiración.
2. El tamaño de las gotas varía ampliamente.
3. La punta del quemador puede verse parcialmente --obstruída.
4. La turbulencia hace que estos quemadores sean ruidosos tanto física, como electrónicamente.

En el quemador lundegardh los oxidantes y el combustible son premezclados en el barril del mismo; la muestra es aspirada al mismo barril y una parte apreciable de ---ella se evapora.

Ventajas:

1. Se incrementa la sensibilidad puesto que el quemador alargado coloca un mayor número de átomos en el trayecto de la luz.
2. Produce una menor turbulencia.

Desventajas:

1. Es más difícil de limpiar.
2. Pueden ocurrir explosiones de la mezcla, sin quemar, de oxidantes y combustible (1, 4).

### 3. Monocromador.

La luz no es constantemente absorbida al pasar a través de las diferentes partes de la flama, debido a que el número de átomos en estado basal varía en las distintas partes de la misma.

El monocromador se usa para separar la línea de resonancia de las demás líneas espectrales que se encuentren en la vecindad. Estas líneas espectrales se originan de otros metales del cátodo vacío y del gas de llenado.

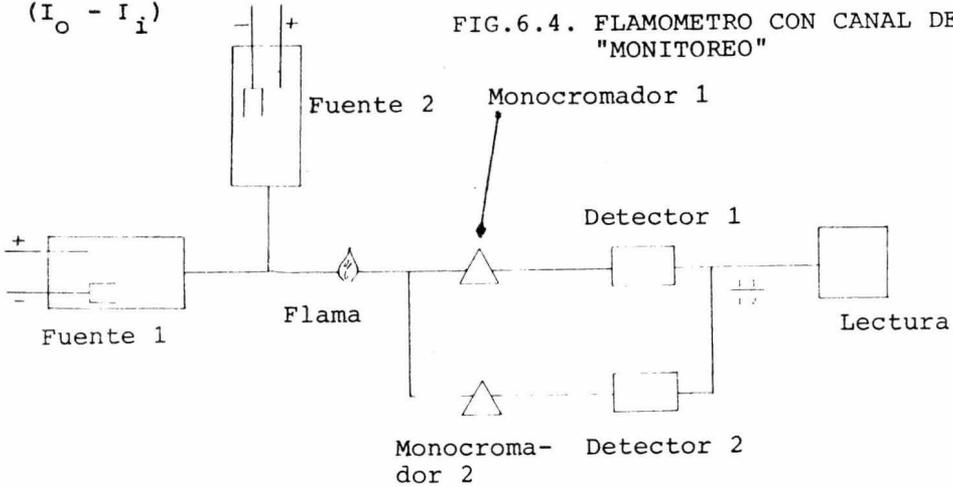
4. Detector. Normalmente se usa un tubo fotomultiplicador. Para que la detección sea adecuada está modulado el equipo. Si se considera la fuente de radiación como  $I_0$ , entonces ésta es reducida a  $I_i$  después de pasar por la flama. Sin embargo, el elemento de interés emite radiación a la misma longitud de onda a la cual la absorbe.

A medida que el átomo excitado retorna al estado basal emite la misma energía que había absorbido. Por lo tanto el detector "ve"  $(I_0 - I_i) + S$ , donde S es la señal de emisión.

La señal de absorción, que debería ser  $I_0 - I_i$ , sería reducida e igual a  $(I_0 - I_i) + S$ . Lo anterior provocaría una reducción de la sensibilidad; para evitar esto se hace la modulación, que puede ser por medios eléctricos o mecánicos. En el método mecánico la potencia de la lámpara, que es una señal dc, se modifica a una señal ac. El detector queda sincronizado a la misma frecuencia, de tal manera que sólo "ve" la señal ac de la fuente de radiación, puesto que la señal de emisión de la flama es --

dc, y el detector no la registra, detectando solamente --  
 $(I_0 - I_i)$

FIG.6.4. FLAMOMETRO CON CANAL DE "MONITOREO"



Una segunda modificación fue el uso del sistema de do-  
 ble haz, en el cual la luz proveniente de la fuente de ra-  
 diación es partida en dos trayectorias: una trayectoria de  
 muestra y una de referencia, la cual va directamente al de-  
 tector. La trayectoria de muestra va de la fuente a la --  
 muestra y finalmente al detector.

En este sistema se determina la proporción entre los-  
 haces de referencia y de muestra.

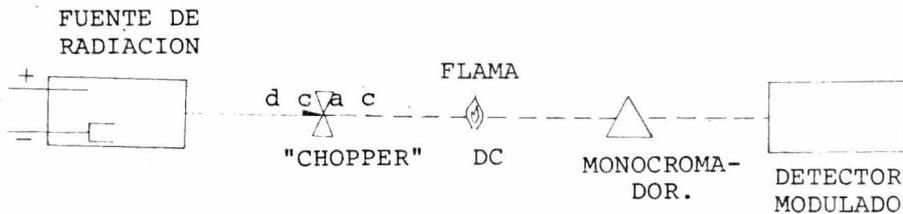


FIG. 6.5 FLAMOMETRO DE ABSORCION DE UN HAZ.

Una tercera modificación, para eliminar los cambios de señal causados por variaciones de la flama, consiste en el uso de un segundo cátodo hueco, otro monocromador y un segundo detector. Los trayectos de luz de ambas lámparas pasan por la flama y se mide la proporción entre la señal de referencia y la de medición.

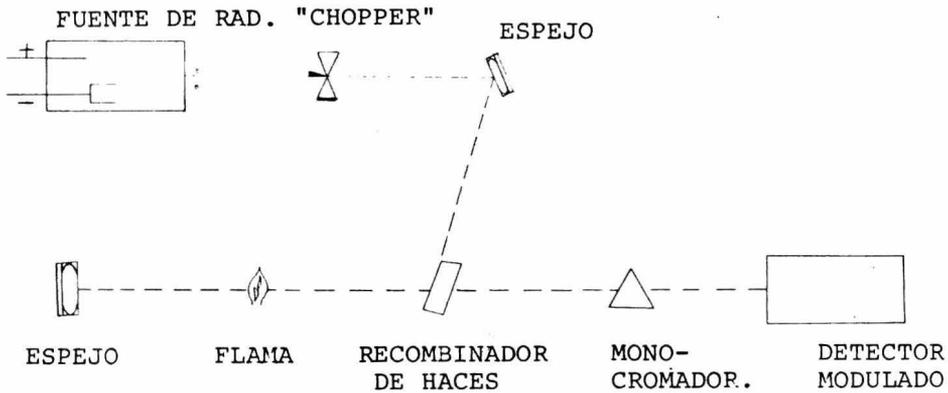


FIG.6.6. FLAMOMETRO DE ABSORCION DE UN HAZ.

En la absorción atómica la concentración es proporcional al logaritmo negativo de la transmitancia y la fórmula para convertir la cantidad de absorción en absorban-

cia es la misma que para convertir el por ciento de transmitancia a absorbancia, es decir,  $A = 2 - \log \%T = 2 - \log (100 - \% \text{ absorción})$ , donde A = absorbancia (1, 4).

#### INTERFERENCIAS

Estas pueden ser: químicas, de ionización o de ma---triz. Las primeras son muy comunes en esta técnica. El número de átomos en el estado basal depende de la estabilidad del metal en la flama; si el compuesto permanece casi totalmente disociado, se forman muchos átomos en estado basal, pero si solo se disocia parcialmente, se originan pocos átomos.

Por ello, el anión predominante puede alterar el número de átomos si se une fuertemente al elemento de interés. Este efecto se elimina añadiendo otro metal que se una con el anión que interfiere.

La interferencia de ionización surge cuando un número sustancial de átomos se ioniza y por lo tanto éstos no absorben en la línea de resonancia del átomo. Para superar este problema puede disminuirse la temperatura de la flama o se puede agregar un exceso de un elemento fácilmente ionizable.

Se nota una interferencia de matriz en las solucio---nes con una alta concentración de sales, lo cual hace de---crecer la señal. Esta interferencia es causada porque --disminuye la eficiencia de atomización de la flama debido a que gran cantidad de la energía de la flama se usa para descomponer las sales presentes. Para evitar esto se pue

den hacer diluciones o extracciones de la muestra.

Un efecto de viscosidad también es llamado interferencia de matriz. Si la viscosidad de las muestras y los estándares varía mucho, la cantidad de muestra que llega al quemador no será la misma para unos y otros. Un aparente decremento de absorción ocurre en las muestras más viscosas.

Para evitar esta interferencia se puede hacer coincidir las viscosidades de las muestras y los patrones o se pueden forzar unos y otros con una bomba peristáltica para que lleguen al quemador en la misma proporción (1, 3, 4).

## VIII. FLUOROMETROS

### INTRODUCCION

La fluorometría es la determinación de la característica y cantidad de luminiscencia producida por una sustancia cuando es examinada bajo condiciones cuidadosamente controladas.

La intensidad de la fluorescencia es directamente -- proporcional a la cantidad de sustancia presente en soluciones diluídas (1).

### PRINCIPIOS

Las moléculas de muchas sustancias tienen la propiedad de absorber energía en porciones específicas del espectro electromagnético. Esto ocurre desde la región de los rayos X hasta la del infrarrojo. Además de absorber radiación, muchas moléculas poseen la propiedad de re-emitir parte de esta radiación absorbida en forma de luminiscencia (disipación de la E absorbida por una molécula, en direcciones casuales), lo cual también ocurre a lo largo del espectro.

La luminiscencia puede ser de dos tipos: fluorescencia o fosforescencia. En el primer fenómeno, una molécula absorbe energía radiante y los electrones del estado -

basal son elevados a un estado excitado en el cual un --- electrón con su spin en una dirección permanece apareado con un electrón con su spin en dirección opuesta. Algunos de estos electrones deben perder energía de una manera no fluorescente para poder alcanzar el nivel vibracional más bajo del estado excitado, antes de regresar a su estado basal.

La energía emitida al retornar al estado basal es me nor que la absorbida. Como la energía (E) está relaciona da a la frecuencia vibracional ( $\nu$ ) por la ecuación  $E = h\nu$ , donde h es la constante de Planck, y la frecuencia está relacionada con la longitud de onda ( $\lambda$ ) por la expresión  $\nu = c/\lambda$ , donde c es la velocidad de la luz, podemos decir que  $E = hc/\lambda$ , es decir, que E varía inversamente con  $\lambda$ .

Por lo anterior, podemos concluir que la longitud de la radiación emitida debe ser mayor que la de la energía de excitación. El proceso de fluorescencia es instantáneo y sucede en  $10^{-8}$  segundos.

La longitud de onda emitida por un compuesto fluores cente tiene un espectro característico de él, el cual es llamado espectro de emisión. La proporción que existe en tre la luz total emitida y la luz total absorbida se llama eficiencia cuántica, y es constante y característica para cada tipo de sustancia fluorescente.

El espectro de emisión y la eficiencia cuántica son independientes de la longitud de onda de la luz excitante. Para que un compuesto flurezca, parte de la luz ex-

citante debe ser absorbida por sus moléculas; el compuesto puede absorber luz a diferentes longitudes de onda y - por lo tanto puede fluorescer a varias longitudes.

Sin importar qué longitud de onda se use, el espectro de emisión de una sustancia, siempre tendrá la misma forma característica y localización para ella. Sin embargo, mientras más cerca esté el espectro de excitación --- (longitudes de onda de luz excitante) del espectro de absorción, mayor será la porción de luz absorbida y proporcionalmente emitida y por ende mayor será la intensidad de la fluorescencia.

Para que una molécula presente fluorescencia, debe poseer una estructura que provea electrones excitables. Los electrones llamados  $\pi$ , presentes en compuestos que tienen un sistema conjugado de dobles ligaduras, son excitables. Las estructuras aromáticas, por tanto, tienden a fluorescer, sobre todo si poseen átomos que contribuyen a la delocalización de los electrones. Los sustituyentes que "jalan" electrones del anillo aromático reducen o eliminan la fluorescencia, puesto que reducen la libertad de estos electrones.

Los compuestos que no son fluorescentes por sí mismos o que son débilmente fluorescentes, pueden ser convertidos químicamente a derivados altamente fluorescentes; algunas reacciones de condensación, sustitución, deshidratación u oxidación y aún el simple cambio del pH logran este objetivo.

La intensidad de la fluorescencia es directamente -- proporcional a la concentración de la sustancia fluores-

cente en soluciones diluidas. De la ley de Lambert-Bouguer-Beer tenemos:

$$I/I_0 = 10^{-acd}$$

donde

- I = intensidad de luz emitida
- I = intensidad de luz excitante
- a = absorbancia
- c = concentración
- d = grosor de la celda

entonces

$1 - I/I_0 = 1 - 10^{-acd}$  = fracción de luz absorbida y

$I_0 - I = I_0 (1 - 10^{-acd})$  = cantidad de luz absorbida

La eficiencia cuántica,  $\phi$ , es la proporción de luz total emitida o F (fluorescencia) a luz total absorbida.- Por lo tanto:

$$F = \phi (I_0 - I)$$

$$\text{o } F = \phi I_0 (1 - 10^{-acd})$$

$$\text{o } F = \phi I_0 \left[ 2.3 \text{ acd} - \frac{(-2.3 \text{ acd})^2}{2} - \frac{(-2.3 \text{ acd})^3}{6} \dots \dots \right]$$

$$\left[ \frac{(-2.3 \text{ acd})^n}{n!} \right]$$

y si c es pequeña, acd también lo es,

$$F = \phi I_0 2.3 \text{ acd}$$

Combinando todas las constantes en un sistema particular,  $F = Kc$ .

Para las ecuaciones anteriores,  $c$  debe ser lo suficientemente pequeña para que sea absorbida la radiación incidente en no más del 5% aproximadamente. Esto significa que a concentraciones bajas,  $F$  es lineal con  $c$  y a concentraciones elevadas se obtiene una curva parecida a la de una desviación negativa de la ley de Lambert y Beer.

En los métodos de absorción, la sensibilidad de la medición depende de la absorción parcial de energía radiante por una substancia en solución; lo cual a su vez es función de la substancia, su concentración y la longitud del trayecto que atraviesa el rayo de energía radiante.

En la fluorometría la sensibilidad de la medición también depende de la intensidad de la energía radiante incidente y de los medios de detección y medición de la fluorescencia. Por lo tanto se puede aumentar la sensibilidad incrementando la intensidad de la radiación excitante y/o la sensibilidad del aparato de detección.

Los procedimientos fluorométricos pueden por tanto ser más sensibles que los espectrofotométricos por un orden de magnitud de  $10^3$  a  $10^4$ .

Puede parecer inconsistente decir que la fluorescencia que es sólo una fracción ( $\phi$ ) del total de energía absorbida, es más sensible que los métodos de absorción, pero consideremos que en la absorción la luz transmitida por una solución es comparada con la cantidad de luz incidente. En la práctica esto se realiza comparando una solución que contiene el material absorbente con una - - -

solución blanco desprovista de él. Se considera que el blanco tiene una transmisión de 100%, y la muestra puede llegar a tener una transmisión de 98%. Si estas lecturas estuvieran sujetas a un error de  $\pm 0.5\%$ , entonces la diferencia de 2% de transmitancia estaría sujeta a un error absoluto de  $\pm 1.0\%T$ , correspondiendo a una incertidumbre de  $\pm 50\%$ .

En la fluorescencia la solución blanco daría una lectura de cero. La misma muestra usada en el ejemplo anterior puede ser ajustada a una lectura de 100; entonces un error de 0.5% de la escala contribuiría un error de sólo 1.0% a la diferencia.

Explicando lo anterior en términos más prácticos tenemos que, en los métodos de absorción el detector está captando pequeñas diferencias en un rayo de luz que emana directamente de la fuente luminosa; en la fluorescencia el detector capta diferencias grandes en la radiación generada en la muestra contra un fondo negro.

Existen, además de los factores instrumentales, ---- otros que afectan la intensidad de la fluorescencia tales como: a) La concentración del material fluorescente puede absorber tanta radiación excitante, que se produzca en la solución un gradiente en la intensidad de la energía excitante. Por lo tanto la  $I_0$  se reduce en la solución y consecuentemente lo mismo sucede con F.

Se pueden cuantificar soluciones concentradas y aun opacas usando equipo que detecta la fluorescencia en la misma cara en la cual incide la energía excitante.

b) Las variaciones en la concentración de la substan  
cia fluorescente pueden afectar las propiedades fluore--  
centes de las moléculas por disociación, asociación y sol  
vatación.

c) La fluorescencia es sensible a variables tales co  
mo la naturaleza del disolvente (usualmente se desplaza a  
longitudes de onda menores, a medida que la constante die  
léctrica se incrementa), pH, temperatura, impurezas y la  
presencia de iones.

d) Los materiales extraños pueden interferir de va--  
rias maneras: fluoresciendo, absorbiendo la energía exci--  
tante o emitida , etc.

e) Los efectos intramoleculares como transiciones --  
electrónicas en las moléculas absorbentes y efectos inter  
moleculares que involucran colisiones bimoleculares o for  
mación de compuestos, pueden provocar que la energía de--  
excitación se disipe en forma de calor. La disminución -  
de la intensidad de emisión teórica es llamada "quenching".

La luz puede ser dispersada de muchas manera y si es--  
to no se reconoce y es remediado, puede interferir con --  
los métodos fluorescentes. La dispersión Rayleigh es la  
reemisión de radiación de la misma longitud de onda que -  
la de la luz incidente y se produce cuando los electrones  
del soluto o disolvente caen al estado basal desde un ni--  
vel vibracional alto, resultante de la absorción de la ra  
diación.

La dispersión Raman se produce por fenómenos simila--  
res, pero difiere en que la energía vibracional adicional

es ganada o perdida causando un cambio en la longitud de onda de la luz emitida, generalmente a longitudes mayores. El efecto Raman es característico del disolvente empleado e independiente de la longitud de onda. La dispersión de la luz incidente también ocurre por partículas presentes en la solución (Efecto Tyndall) (1, 3, 10).

#### COMPONENTES BASICOS DE UN FLUOROMETRO.

1. Fuente de energía radiante.
2. Monocromador primario: Selecciona la longitud de onda de excitación. Es más frecuente el uso de filtros, pero se pueden adquirir rejillas de difracción o prismas.
3. Porta-muestras.
4. Monocromador secundario: Selecciona la longitud de onda de emisión.
5. Fotodetector: Convierte la luz en energía eléctrica.
6. Medidor: Mide la energía eléctrica (1, 3, 4).

1. Fuentes de Energía Radiante. Estas fuentes deben ser ricas en luz ultravioleta y de una intensidad alta. Las fuentes más comunes son lámparas de arco de mercurio y xenón, aunque también se pueden usar las de filamento de tungsteno o zinc.

Una lámpara de arco de xenón emite un espectro continuo de 200 a 800 nm. y no emite un espectro lineal; la lámpara de arco de mercurio es la más usada y emite un espectro lineal de 200 a 1000 nm., cuyas líneas principales son de 365, 405, 436 y 546 nm. Si un compuesto fluoresce--

cente no es suficientemente excitado con una de estas longitudes de onda, se puede usar la línea más cercana al pico de absorbancia del compuesto.

Para seleccionar la longitud de onda a emplear, se manipula el selector del prisma, rejilla de difracción o filtro (1, 4, 10).

2. Monocromadores. Los fluorómetros de filtro usan filtros de vidrio o filtros Wratten. El filtro primario se coloca frente a la fuente de energía y se usa para seleccionar la línea de mercurio más próxima al pico de absorbancia del compuesto a analizar. El filtro secundario se coloca frente al fotodetector y se usa para seleccionar la longitud de onda de la luz fluorescente que debe medirse.

Los filtros primario y secundario no deben tener una longitud de onda común, es decir, deben ser mutuamente excluyentes, tal que si se colocan juntos frente a una fuente de luz, no deben permitir el paso de la misma. Si ambos filtros permiten el paso de una longitud de onda igual esta luz puede alcanzar el fotodetector al ser dispersada por la solución.

En los espectrofluorómetros las longitudes de onda excitantes y emitidas pueden seleccionarse con prismas o rejillas de difracción. El monocromador primario se coloca frente a la fuente de luz y el secundario se coloca frente al fotodetector (1, 4, 10).

3. Porta-muestras. A longitudes de onda de 315 a 320 nm. se pueden usar porta-muestras de vidrio, pero a -

longitudes de onda menores se deben usar las de cuarzo.

También pueden usarse los tubos transparentes de poliestireno en las partes visible y ultravioleta del espectro, siendo factor limitante el efecto del disolvente sobre el poliestireno (4).

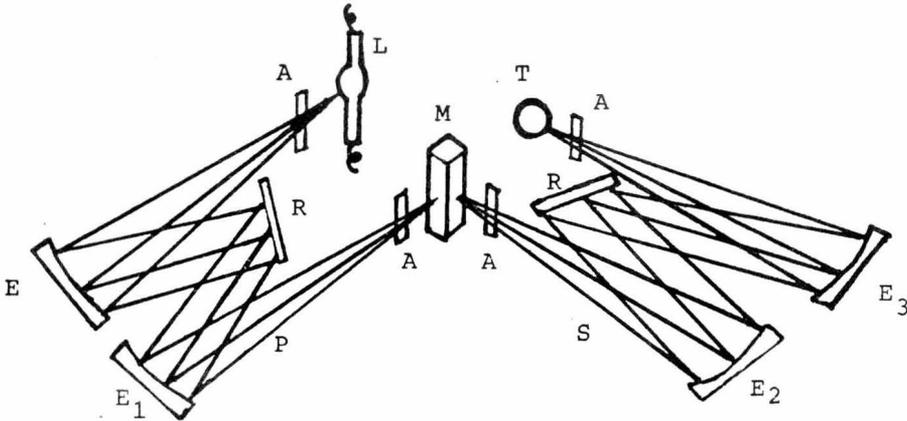
4. Detectores. Se usan tubos fotomultiplicadores en los cuales el potencial eléctrico varía directamente con la cantidad de fluorescencia y por lo tanto con la concentración del compuesto fluorescente. Este potencial es amplificado y leído en un medidor.

Si el fluorómetro se usa para medir luz visible y ultravioleta se requieren dos tubos fotomultiplicadores, -- uno de los cuales será ultravioleta sensible (4)

#### ESPECTROFLUOROMETRIA.

La diferencia entre la espectrofluorometría y la --- fluorometría radica en el grado de sofisticación del -- aparato en lo que respecta a los medios para aislar la -- energía radiante (1).

En la figura 7.1 se ilustran los componentes básicos de un espectrofluorómetro.



- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| L: LAMPARA DE ARCO DE XENON. | M: PORTAMUESTRAS           |
| A: ABERTURAS                 | T: TUBO FOTOMULTIPLICADOR. |
| P: MONOCROMADOR PRIMARIO     |                            |
| S: MONOCROMADOR SECUNDARIO   |                            |
| R: REJILLAS DE DIFRACCION    |                            |
| E: ESPEJOS CONCAVOS          |                            |

FIGURA 7.1 (1)

Una lámpara de arco de xenón es la fuente de radiación excitante. Esta lámpara produce una emisión continua de 200 a 800 nm.

En algunos instrumentos se usa un espejo elipsoidal para dirigir la radiación al monocromador primario. Los fabricantes proveen diferentes arreglos de aberturas pero todos sirven para definir el paso de banda espectral de los monocromadores primario o de activación y secundario o de fluorescencia.

Los monocromadores generalmente son rejillas de difracción usadas conjuntamente con espejos cóncavos para dirigir la luz como se muestra en la figura.

El compartimento para el porta-muestras puede ser diseñado para elementos redondos o rectangulares.

La disposición más común para todos estos elementos es la que se muestra en la figura 7.1, donde la luz fluorescente se ve perpendicularmente a la luz excitante.

El tubo fotomultiplicador es normalmente del tipo 1P21 o 1P28. La respuesta de estos tubos decrece fuertemente en la región de los 600 nm., lo cual causa un espectro fluorescente distorsionado. Este efecto puede ser compensado usando factores de corrección establecidos, usando otros tubos fotomultiplicadores más caros como el R446S o usando un instrumento que electrónicamente efectúa las correcciones.

Los resultados pueden ser presentados en un medidor, un osciloscopio, o impresos en una tira de papel (1).

#### FLUOROMETROS DE FILTRO

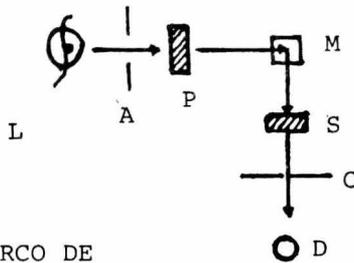
En los fluorómetros la fuente de energía es una lámpara de arco de mercurio. Una abertura ajustable se usa para variar la cantidad de energía excitante que se dirige a la muestra colocada en el porta-muestra.

La longitud de onda excitante se selecciona con un filtro primario que puede ser de vidrio, de gelatina (Wratten), o de interferencia. Los filtros secundarios son

de vidrio y se escogen para excluir las dispersiones ---- Rayleigh y Raman, así como para seleccionar una región de longitudes de onda para mejorar la detección de la fluo-- rescencia.

Como detectores se pueden usar fotoceldas de capa de barrera, fototubos o tubos fotomultiplicadores.

Se debe incluir un "cerrador" para ajustar el aparato al cero (1, 2, 10).



- L: LAMPARA DE ARCO DE MERCURIO.
- A: ABERTURA
- P: FILTRO PRIMARIO
- S: FILTRO SECUNDARIO
- D: DETECTIVES
- C: "CERRADOR"

FIG. 7.2 (1)

## MANEJO Y CUIDADOS

1. Los disolventes usados no deben ser fluorescentes y no deben absorber energía en las regiones espectrales usadas en un experimento dado.

2. Los porta-muestras de Pyrex o cuarzo son los adecuados para este tipo de determinaciones, puesto que los de vidrio presentan una ligera fluorescencia. Debe evitarse que se rayen puesto que se aumentaría la dispersión.

Las ventanas no deben ser tocadas con los dedos puesto que se puede contaminar con materiales fluorescentes o absorbentes de radiación.

La limpieza de los porta-muestra debe hacerse con detergentes no fluorescentes o con ácido nítrico caliente.

3. Se deben revisar los filtros puesto que algunos presentan fluorescencia.

4. Se debe evitar la contaminación con grasa.

5. Se han encontrado contaminantes fluorescentes en el agua y los reactivos que han estado en contacto con tapones de hule, polietileno y baquelita.

6. El pH debe ser cuidadosamente controlado debido al gran efecto que ejerce sobre la fluorescencia, en el caso de muchas substancias.

7. La temperatura debe controlarse por dos razones:-  
a) La fluorescencia decrece al aumentar la temperatura y  
b) Los cambios de temperatura durante las mediciones provocan dispersión de la luz debido a estratificación, variación del índice de refracción y turbulencia.

8. Las soluciones a analizar deben estar libres de burbujas de gas, sólidos suspendidos y turbidez. Para evitar la formación de burbujas puede ser necesario hervir y enfriar la solución.

Tanto las partículas como las burbujas provocan que las lecturas de fluorescencia sean menores que los valores reales, puesto que dispersan la luz emitida.

Los sólidos en suspensión pueden eliminarse por centrifugación o filtración; el papel usado para este último proceso debe estar libre de toda fluorescencia.

9. La energía radiante excitante, algunas veces varía el color o la intensidad de la fluorescencia y en estos casos debe hacerse la lectura rápidamente puesto que el efecto descrito se efectúa lentamente.

10. Cuando se trabaja con cantidades del orden de microgramos se tienen pérdidas por adsorción del material de vidrio, fotodescomposición de los derivados fluorescentes al prepararse y durante las lecturas y/o por oxidación con disolventes.

11. La presencia de sustancias que interfieren provocando "quenching" o alterando el color de la fluorescencia pueden ser detectadas corriendo un estándar interno. Si se obtienen lecturas bajas para éste, el cual ha sido preparado en una porción de la muestra, sabremos que existe material interferente.

Comparando la muestra con el estándar interno se puede corregir el "quenching".

## MANEJO

La manera de operar los fluorómetros varía de instrumento a instrumento y se describe detalladamente en los folletos que acompañan el equipo, pero los pasos principales son: El instrumento se lleva a cero con un blanco de reactivo no fluorescente y después un punto conveniente se ajusta a un estándar de referencia, por ejemplo, un punto de referencia de 50 en el medidor puede ser escogido para un estándar equivalente a 50 g/100 ml.

Para ajustar el instrumento es conveniente usar una solución fluorescente estable como la de sulfato de quinina, fluoresceína de sodio o un vidrio fluorescente (1, 2, 3, 4).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FLUOROMETRIA.

La principal ventaja de la fluorometría es la mayor sensibilidad que tiene con respecto a los otros métodos de absorción. En la fluorometría se mide directamente la cantidad de luz emitida, mientras que en los métodos de absorción se mide la cantidad de luz absorbida por diferencia. A medida que la transmitancia de una solución se acerca al 100% se incrementa el error.

Aunque en la fluorometría se usen soluciones muy diluídas, se puede compensar esto incrementando la intensidad de la lámpara de excitación.

Una segunda ventaja de este método es la especificidad, puesto que una substancia que absorbe luz pero no fluoresce, no interferirá con la medición efectuada.

En la fluorometría se usan dos longitudes de onda -- (la de excitación y la de emisión) y aunque dos substancias absorban a la misma longitud de onda no necesariamente emiten a longitudes idénticas.

La principal ventaja de este método es que es muy -- sensible al medio ambiente.

Un incremento en la temperatura provoca un decremento en la fluorescencia; un compuesto puede fluorescer, algunas veces, en una pequeña variación de pH o puede suceder que lo haga en una variación amplia, pero manteniendo su máxima fluorescencia en una área pequeña.

El disolvente también puede afectar la intensidad de la fluorescencia. Muchos compuestos fluorescentes sufren fotodescomposición al ser expuestos a la luz ultravioleta, lo cual obliga a hacer la medición rápidamente o a disminuir la energía de excitación.

Finalmente, la fluorescencia de una substancia puede verse disminuída por interacción con otra substancia presente en la solución (4).

## R E S U M E N

- 1).- Se realizó una introducción, en la cual se señala la finalidad del presente trabajo y se justifica el mismo.
- 2).- Se presentan brevemente los antecedentes que sirvieron como punto de partida para el desarrollo de los instrumentos que se conocen hoy en día.
- 3).- Se revisaron los conceptos que dan definición a las leyes de la colorimetría.
- 4):- Se revisó un vocabulario de los términos empleados - en colorimetría y su definición.
- 5).- Se describen los colorímetros ópticos como los instrumentos más simples y de uso común en épocas en que no se contaba con los fotocolorímetros.
- 6).- Se hizo lo propio con los fotocolorímetros.
- 7).- Se cita a la espectrofotometría como la principal -- instrumentación del laboratorio clínico; se enumeran sus principios y se hace una descripción de los componentes que a continuación mencionaremos, así como de su función e importancia.

- a).- Fuentes de poder
- b).- Fuentes de energía radiante.
- c).- Monocromadores.
- d).- Cubetas.
- e).- Sistema receptor para captar la energía transmitida y convertirla a energía eléctrica.
- f).- Dispositivos empleados para medir la corriente generada.

8).- Se tratan, dentro de la misma espectrofotometría, los siguientes puntos:

- a).- Selección del tipo de instrumento.
- b).- Factores que afectan la longitud de onda y calibración de la misma.
- c).- Patrones de transmitancia.
- d).- Blancos de reactivo.
- e).- Determinación de la cantidad de energía dispersada.
- f).- Desviaciones de la ley de Beer.
- g).- Precisión fotométrica.
- h).- Gráficas de espectro de absorción.
- i).- Elección de la longitud de onda para trabajos -- cuantitativos.
- j).- Gráficas de calibración, su comprobación y uso.
- k).- Efecto de la luz dispersada.
- l).- Errores fotométricos que se originan en el instrumento y en la muestra.

9).- En lo que respecta a la flamometría, se hace referencia a la existencia de la flamometría de absorción, - emisión y fluorescencia atómicas, así como los princi

pios por los cuales se rigen los dos primeros tipos.

10).- En flamometría de emisión atómica se hace mención de los siguientes factores:

- a).- Combustibles empleados.
- b).- Tipos de flamas.
- c).- Quemadores y atomizadores.
- d).- Sistemas ópticos.
- e).- Detectores.
- f).- Manejo y cuidado de los flamómetros.
- g).- Método del patrón interno.
- h).- Fuentes de error.

11).- Se trata el tema de flamometría de absorción en base a los siguientes puntos:

- a).- Fuentes de radiación.
- b).- Quemadores y atomizadores.
- c).- Monocromadores.
- d).- Interferencias.

12).- Se hace una introducción al estudio de la fluorometría y se mencionan los principios de la misma.

13).- Se describen los componentes de un fluorómetro en el orden siguiente:

- a).- Fuentes de energía.
- b).- Monocromadores primarios.
- c).- Cubetas.
- d).- Monocromadores secundarios.
- e).- Fotodetectores.
- f).- Medidores de energía eléctrica.

14).- Finalmente, se tratan los incisos que a continuación citamos:

a).- Fluorómetros de filtro.

b).- Manejo y cuidados de los fluorómetros.

c).- Ventajas y desventajas de la fluorometría.

15).- Se formulan conclusiones orientadas a mejorar la preparación del estudiante de la carrera de Q.F.B. --  
(Orientación bioquímico-microbiólogo).

## C O N C L U S I O N E S

A continuación presentamos las conclusiones en un formato que la Facultad de Química recomienda para este tipo de estudios. Dicho formato consta de dos secciones: la -- primera señala el tema desarrollado y el tiempo que normalmente se ocupa para su exposición durante las clases teóricas y prácticas. Esta sección está dividida en dos columnas, la primera de las cuales contiene los conceptos tratados en esta tesis y la segunda describe la habilidad que se desarrolla mediante el estudio de dichos conceptos.

La segunda sección está encabezada con el título de -- antecedentes y está dividida en tres columnas, de las cuales, la primera se emplea para anotar la, o las materias -- que sirven como antecedente a cada uno de los puntos tratados. La segunda columna se emplea para describir los conceptos que deben revisarse en las materias consideradas como antecedentes, y finalmente, la tercera columna señala -- la habilidad que debe desarrollarse en función de los conceptos estudiados.

La letra minúscula señala los antecedentes estudiados durante la carrera de Q.F.B. (orientación Bioquímico-Microbiólogo) y la letra mayúscula indica los antecedentes que no son estudiados y que consideramos necesarios para com--

prender los temas tratados en este trabajo.

Como podrá deducirse del formato que a continuación se presenta, la preparación recibida en la carrera de Q.-F.B. (orientación Bioquímico-Microbiólogo), en lo que respecta a instrumentación para un laboratorio clínico, es muy deficiente, sobre todo en lo que respecta a Análisis-III, Análisis IV y Física (en sus ramas de Óptica, Electricidad y Magnetismo).

Consideramos que, siendo el enfoque dado a esta carrera eminentemente clínico, deben subsanarse éstas deficiencias.

El Sr. Q.F.B. Ramón Guevara Estrada ha añadido a este formato la columna encabezada bajo el título de Materia.

ANALISIS QUIMICO-CLINICOS 036-Q-10 Q.F.B.

TEMA: INSTRUMENTACION PARA EL LABORATORIO CLINICO.

A N T E C E D E N T E S

CONCEPTO:	HABILIDAD:	MATERIA:	CONCEPTO:	HABILIDAD:
1. Antecedentes del desarrollo de los instrumentos empleados actualmente.	Conocimiento de los "aparatos primitivos" y de las necesidades que orillaron a la creación de nuevos instrumentos.	-----	Concepto nuevo.	-----
2. Ley de Lambert-Bouguer-Bunsen-Roscoe-Beer.	Conocimiento, comprensión, deducción y aplicación de la ley en la cual se basan las técnicas analíticas espectro fotométricas y sus derivados.	Análisis • I	Concepto de color	Comprensión del fenómeno que provoca la aparición de color en una substancia.
		Físicoquímica I	Naturaleza de la luz. Teoría cuantitativa de la luz. Teoría dual de la luz.	Comprensión de lo que es la luz.
		Análisis IV	Concepto de longitud de onda, frecuencia número de onda, espectro radiante y energía radiante.	Conocimiento de los parámetros que describen un haz de energía radiante.

ANALISIS QUIMICO-CLINICOS 036-Q-10 Q.F.B.

TEMA: INSTRUMENTACION PARA EL  
LABORATORIO CLINICO.

ANTECEDENTES:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

MATERIA:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

Análisis  
IV

Concepto de -  
absorción y -  
transmisión.

Habilidad para com-  
prender la ley de -  
Lambert y Beer.

Análisis  
IV

Ley de Lambert -  
y Beer.

Habilidad para el ma-  
nejo adecuado de las-  
fórmulas matemáticas-  
que expresan esta ley  
en sus variantes de -  
absorción y/o transmi-  
sión de la luz a tra-  
vés de soluciones (co-  
loridas o no) que ab-  
sorban energía radian-  
te.

Análisis  
IV

CONOCIMIENTO DE LA --  
EXISTENCIA DE DICHA--  
DESVIACIONES, SUS CAU-  
SAS Y CORRECCIONES NE-  
CESARIAS.

TEMA: INSTRUMENTACION PARA EL  
LABORATORIO CLINICO.

ANTECEDENTES:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

MATERIA:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

3. Colorímetros  
Opticos.

Conocimiento y aplicación de los fundamentos de la colorimetría y de la fotometría; definición de estos términos. Operaciones que involucra un procedimiento colorimétrico. Distintas formas en que se lleva o se ha llevado a cabo la comparación de intensidad de colores con fines analíticos. Descripción y manejo del colorímetro de Duboscq.

Análisis  
IV

FISICA

Fundamentos de la colorimetría.

REFLEXION  
REFRACCION  
DIFRACCION  
PRISMAS  
ESPEJOS PARABOLICOS  
FILTROS.

Conocimiento y aplicación de las mediciones fotométricas.

CONOCIMIENTO Y APLICACION DE LA OPTICA A LOS COLORIMETROS OPTICOS.

4. Fotocolorímetros.

Conocimiento y aplicación de los fundamentos de los fotocolorímetros. Comprensión de la constitución de fotocolorímetros de una y dos celdas, así como el modo de emplearlos.

Física  
III

Potencial eléctrico, puente de Wheatstone. Magnetismo. Corriente directa y corriente alterna. Resistencias.

Conocimientos muy superficiales de dichos conceptos que permiten tener una leve idea del funcionamiento de dichos instrumentos.

ANALISIS QUIMICO-CLINICOS 036-Q-10 Q.F.B.

TEMA: INSTRUMENTACION PARA EL LABORATORIO CLINICO.

ANTECEDENTES:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

MATERIA:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

5. Espectrofotómetros.

Conocimiento del significado de los términos relacionados con la espectrofotometría.  
Enumeración y discusión de los elementos que componen un espectrofotómetro, así como la función que desempeña cada uno.

Análisis IV

FISICA

ANALISIS IV

Análisis IV

Físicoquímica I

Fundamento que sirve de base al fotocolorímetro y su empleo.

CONCEPTOS DE OPTICA (YA MENCIONADOS).  
CELULAS FOTO ELECTRICAS Y GALVANOMETROS.

ERRORES FOTOMETRICOS ORIGINADOS EN EL INSTRUMENTO.

Ley de Lambert y Beer.  
Teoría de la resolución de mezclas.

Naturaleza de la luz. Teoría cuántica y dual de la misma.

Ajuste y calibración de dichos instrumentos.

CONOCIMIENTOS DE OPTICA ELECTRICIDAD Y MAGNETISMO QUE AYUDAN A CONOCER LA FORMA EN QUE FUNCIONAN ESTOS INSTRUMENTOS.

HABILIDAD PARA EVITAR DICHOS ERRORES.

Habilidad para el manejo de dicha ley así como de los términos que implica el conocimiento de la misma.

Comprensión de la naturaleza de la luz.

ANALISIS QUIMICO-CLINICOS 036-Q-10 Q.F.B.

TEMA: INSTRUMENTACION PARA EL LABORATORIO CLINICO

ANTECEDENTES:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

MATERIA:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

de ellos.  
Aspectos prácticos en su uso para la resolución de problemas.

ANALISIS IV

DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER

CONOCIMIENTOS DE SUS CAUSAS Y POSIBLES SOLUCIONES.

OBTENCION DE GRAFICAS DE ABSORCION Y CALIBRACION.

ANALISIS DE DICHAS GRAFICAS PARA LA OBTENCION DE DATOS QUE PERMITAN LA RESOLUCION DE PROBLEMAS.

CONCEPTO DE LUZ DISPERSADA.

EFECTO DE LA MISMA Y MEDIOS PARA EVITAR LOS MISMOS.

ERRORES FOTOMETRICOS ORIGINALES EN EL INSTRUMENTO.

CONOCIMIENTO DE LOS FACTORES QUE LOS PROVOCAN ASI COMO LAS SOLUCIONES POSIBLES.

FISICA

CONCEPTOS DE OPTICA (YA MENCIONADOS), CELULAS FOTOELECTRICAS, FUENTES DE PODER, CELDAS FOTOVOLTAICAS, TUBOS FOTOEMISIVOS. AMPLIFICACION.

HABILIDAD NECESARIA PARA COMPRENDER EL FUNCIONAMIENTO DE LOS ELEMENTOS QUE COMPONEN UN ESPECTROFOTOMETRO.

ANALISIS QUIMICO-CLINICOS 036-Q-10 Q.F.B.

TEMA: INSTRUMENTACION PARA EL LABORATORIO CLINICO.

ANTECEDENTES:

CONCEPTO:

HABILIDAD:

MATERIA:

CONCEPTO:

HABILIDAD.

6. Flamómetros.

Conocimiento de los componentes de los flamómetros, así como del funcionamiento de cada uno de ellos. Bases teóricas en las cuales se apoya la flamometría.

FISICA

ANALISIS IV

ANALISIS III

ANALISIS III

ANALISIS IV

FISICA

DE SEÑALES -  
ELECTRICAS.

LOS MISMOS CITADOS EN ESPECTROFOTOMETROS.

BASES TEORICAS EN LAS CUALES SE APOYA LA FLAMOMETRIA.

COMPONENTES DE LOS FLAMOMETROS.

COMPONENTES DE LOS FLUOROMETROS.

BASES QUE SUSTENTAN LA FLUOROMETRIA.

LOS MISMOS EXPRESADOS ANTERIORMENTE.

CONOCIMIENTO DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS AMPLIFICADORES.

PARA COMPRENDER EL FUNCIONAMIENTO DE LOS ELEMENTOS DEL INSTRUMENTO.

CONOCIMIENTO DEL FUNDAMENTO DE LAS TECNICAS DE FLAMOMETRIA.

IGUAL QUE FLUOROMETROS.

CONOCIMIENTO DE LOS ELEMENTOS QUE FORMAN EL INSTRUMENTO Y EL FUNCIONAMIENTO DE LOS MISMOS.

COMPRESION DEL FENOMENO QUE PERMITE EL EMPLEO DE ESTA TECNICA.

7. FLUOROMETROS.

Bases teóricas en las cuales se apoya la fluorometría.

Descripción de los elementos que forman un fluorómetro, así como la función que cada uno de ellos desempeña.

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Henry, J. R., Cannon, C. D. & Winkelman, W. J. (Ed): Clinical Chemistry. Principles and Technics. Harper & Row, Publishers, USA, 1974.
- 2.- Davidsohn, I. & Henry, B. J.: Clinical Diagnosis by-Laboratory Methods. W. B. Saunders Company. USA.
- 3.- Galen, W.E.: Instrumental Methods of Chemical Analysis. McGraw Hill Company. USA, 1960.
- 4.- Hicks, R.: Laboratory Instrumentation. Harper & Row, Publishers, USA, 1974.
- 5.- Kolmer, A. J., Spaulding, H. E. & Robinson, W. H.: - Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana, S. A. México, 1955.
- 6.- Kolmer, A. J., Spaulding, H. E. & Robinson, W. H.: - Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana, S. A. - México, 1948.
- 7.- Lehninger, L. A.: Biochemistry. Worth Publishers, - Inc. USA, 1971.
- 8.- Oser, L. B.: Hawk's Physiological Chemistry. McGraw Hill Book Company. USA, 1965.
- 9.- Sears, W. F.: Fundamentos de Física: Electricidad y-Magnetismo. Aguilar, S. A. de Ediciones. España, - - 1965.
- 10.- Willard, H. H., Merritt, L. L. & Dean, A. J.: Méto--dos Instrumentales de Análisis. Compañía Editorial - Continental, S. A. México, 1968.