

137
2eq.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

METODOS POLAROGRAFICOS PARA EL ANALISIS
FISICO-QUIMICO DE SALIVA HUMANA.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA QUIMICA
P R E S E N T A
OLIVIA RIVERA HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

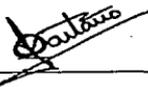
JURADO ASIGNADO

Presidente : Prof. Victor Manuel Castaño Meneses.
Vocal: Prof. Eduardo Rodríguez de San Miguel.
Secretario: Prof. Juana Judith Chávez Espín.
1er suplente: Prof. José Luz González Chávez.
2do. suplente: Prof. Eric Mauricio Rivera Muñoz.

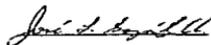
SITIO DONDE DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Química Analítica.
División de Estudios de Posgrado.
Facultad de Química, UNAM.

Asesor: Dr. Victor M. Castaño Meneses



Supervisor Técnico: Dr. José Luz González Chávez



Sustentante: Olivia Rivera Hernández



DEDICATORIAS

A mi padres: Daniel Rivera Pérez y Margarita Hernández Navarro.

Por todo el apoyo, cuidado, consejo, sabiduría . . . y cariño que me han brindado siempre y a los cuales tengo que agradecer quien soy..

A mis hermanos:

Margarita.

Daniel Francisco.

Alicia.

Rosaura.

Por todos aquellos momentos (buenos y malos) que hemos pasado juntos.

También a Alejandra, Dany , Hector y Alberto Fermín.

A toda mi familia y amigos.

Finalmente a Javier Bulás, por quien siento un cariño muy especial y con quien espero seguir compartiendo tantos momentos.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Mireya González B..

Por su participación en ésta tesis como asesora externa y por los valiosos conocimientos en saliva aportados a la misma.

A las personas que integraron mi jurado de examen por sus valiosos comentarios, los cuales hicieron que este trabajo tuviera una mejor calidad.

Profesor. Víctor M. Castaño Meneses.
Profesor. Eduardo Rodríguez de San Miguel.
Profesora. Juana Judith Chávez Espín.
Profesor. José Luz González Chávez.
Profesor. Eric Mauricio Rivera Muñoz.

Al Instituto de Física UNAM. por el apoyo brindado.

A la Facultad de Química UNAM, Departamento de Química Analítica por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: GENERALIDADES	
1.1 Agua corporal.	3
1.2 Transporte de materiales através de la membrana celular.	4
CAPÍTULO II : SALIVA	
2.1 Definición de saliva.	6
2.2 Histología de las glándulas salivales.	6
2.2.1 División por su tamaño.	7
2.2.2 División por su tipo de secreción.	7
2.3 Formación y secreción de la saliva.	8
2.4 Características y funciones de la saliva.	9
2.4.1 Características físicas.	9
2.4.2 Flujo salival.	9
2.5 Composición de la saliva humana.	11
2.6 Funciones biológicas de la saliva.	12
2.7 Sialoquímica.	14
CAPÍTULO III: POLAROGRAFÍA	
3.1 Aplicaciones de la polarografía.	15
3.2 Reacciones electroquímicas.	17

3.3 Tipos de electrodos.	18
3.4 Formas de transporte.	19
3.5 Electrodo de gota de mercurio (EGM).	20
3.5.1 Fabricación de un (EGM).	20
3.5.2 Arreglo con tres electrodos.	22
3.5.3 Ventajas y limitaciones del EGM.	26
3.6 Polarografía de pulsos.	27
3.6.1 Polarografía diferencial de pulsos.	27
3.6.2 Polarografía normal de pulsos.	28
3.7 Potenciometría.	29
3.7.1 Precauciones y limitaciones del electrodo de ion-selectivo.	30

CAPÍTULO IV : DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Descripción del equipo.	31
4.2 Reactivos y material.	32
4.3 Recolección y manejo de muestra.	34
4.4 Potencial de media onda.	35
4.5 Metodología.	36
4.5.1 Curvas de calibración.	37
4.5.2 Determinación de cloro (Cl^-).	38
4.5.3 Determinación de calcio (Ca^{2+}).	38
4.5.4 Determinación de potasio (K^+).	39
4.5.5 Determinación de sodio (Na^+).	40

CAPÍTULO V : RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados de las curvas de calibración.	41
5.1.1 Cloro.	41
5.1.2 Calcio.	43
5.1.3 Sodio.	45
5.1.4 Potasio.	48
5.2 Resultados y discusión de resultados.	51
5.2.1 Cloro.	51
5.2.2 Calcio.	53
5.2.3 Sodio.	55
5.2.4 Potasio.	56
5.3 Comparación de resultados.	59

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones.	61
--------------------------	-----------

ANEXO A: ABSORCIÓN ATÓMICA	63
-----------------------------------	-----------

ANEXO B: DETERMINACIÓN DE CLORO	66
--	-----------

BIBLIOGRAFÍA	68
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido complejo de gran importancia para nuestro organismo, ya que mantiene la homeostasis (" las diferentes disposiciones fisiológicas que sirven para restaurar el estado normal, una vez que éste ha sido trastornado") de la cavidad bucal. Desde hace años es una fuente de gran información sobre el estado de salud de nuestro organismo, también ha servido de apoyo para monitorear las concentraciones de fármacos en pacientes o diagnosticar enfermedades locales que afectan a las glándulas salivales.

Su uso se basa en la relación constante entre la concentración de plasma y los niveles salivales. Existen varias ventajas en el uso de la saliva y es que no se somete al paciente a dolor o le ocasiona malestares y es mucho más seguro que trabajar con sangre, con la cual se expone al recolector a contagiarse de VIH o hepatitis con mayor facilidad.

Otra de las ventajas que se han observado es que mediante la saliva se pueden detectar algunas funciones fisiológicas del cuerpo como, por ejemplo, el periodo de ovulación de la mujer en donde las concentraciones de calcio, potasio y cloro disminuyen, para este tipo de diagnostico no es necesario la toma de varias muestras.

Para lograr lo anterior se ha buscado un método de fácil aplicación, no muy costoso, que no sea destructivo hacia la muestra y que el consumo de la misma sea mínima al ser analizada, esta última y es debido a que estudios recientes realizados por los Doctores Aguirre y Cols, demuestran que los niveles de saliva producidos por un sector de la población mexicana son menores al de algunas poblaciones extranjeras.

El objetivo general de esta tesis es utilizar la técnica conocida como polarografía, para determinar los principales electrolitos en la saliva como son: sodio, potasio, calcio y cloro.

Al utilizar este equipo no se destruye la muestra, el consumo es mínimo y puede servir para otros análisis posteriores.

CAPÍTULO I
GENERALIDADES

GENERALIDADES

1.1 Agua corporal.

El ambiente interno del organismo es fundamentalmente un medio líquido, en donde, el agua es el componente más abundante del cuerpo humano, ya que constituye aproximadamente el 60% del peso corporal.

Se puede considerar que el agua corporal total (ACT) está distribuida en dos compartimientos (Figura 1.1): el compartimiento extracelular y el compartimiento intracelular.⁽¹⁾

a) El compartimiento extracelular o líquido extracelular (LEC): comprende aproximadamente 33% del ACT. El líquido extracelular incluye: 1) el agua plasmática, 2) el líquido intersticial, 3) hueso, 4) tejido conectivo y 5) líquido transeelular. Su composición tiene como catión predominante al sodio (Na^+) con una concentración entre 136-145 mEq/L y al anión cloro como cloruro (Cl^-) con una concentración entre 96-106 mEq/L.⁽²⁾

b) El compartimiento intracelular o líquido intracelular (LIC): representa aproximadamente el 65% del ACT. Este valor se obtiene con la suma del contenido líquido de todas las células del cuerpo. Su composición tiene como catión

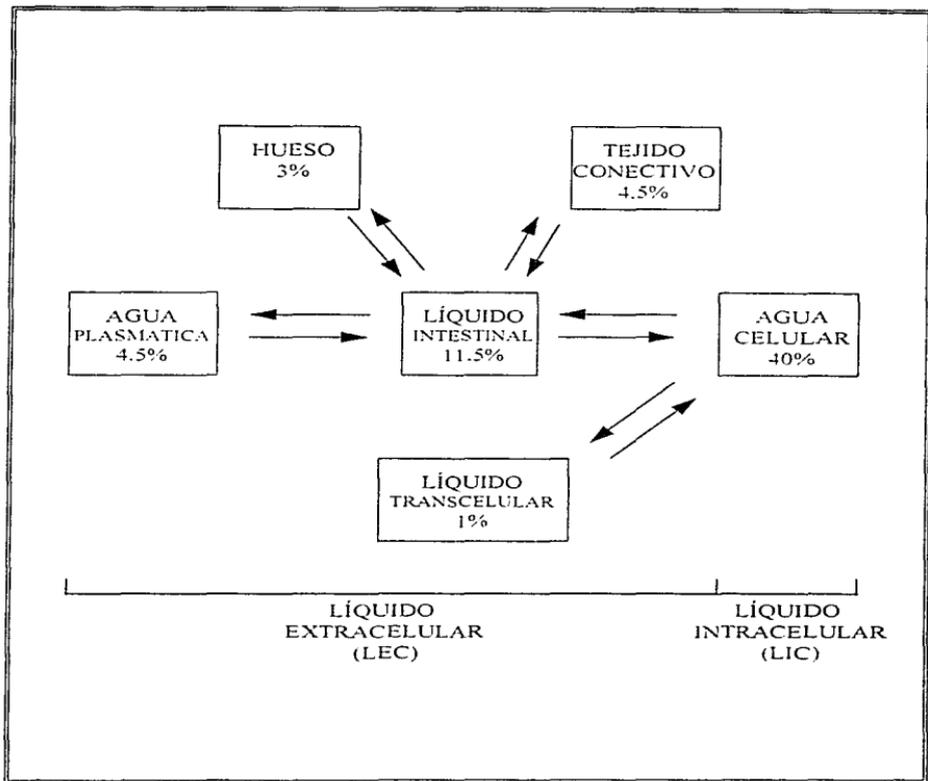


Figura. 1.1 Distribución del agua corporal total en un paciente de 70 kilos. El porcentaje se refiere a la fracción de peso corporal en cada compartimento.

predominante al potasio (K^+) en el interior de la célula, con una concentración entre 141-150 mEq/L y al fosfato (PO_4^{3-}) con una concentración entre 70-85 mEq/L.⁽²⁾

1.2 Transporte de materiales a través de la membrana celular.

El transporte de materiales a través de la membrana celular se logra en virtud de dos procesos básicos: transporte pasivo y transporte activo.⁽³⁾

El transporte pasivo es el desplazamiento de una sustancia desde una región en donde la concentración es elevada hasta otra región donde su concentración es menor.

En el transporte activo hay que proporcionar energía al sistema para mover a una sustancia contra su gradiente de concentración.

La difusión de electrolitos se realiza por medio del transporte activo, en la Figura 1.2 se comprueba que existe una gran diferencia entre la concentración de diversos iones en el LEC y el LIC. esta diferencia de concentraciones forma un gradiente electroquímico a través de la membrana celular, tal gradiente no puede conservarse durante toda la vida sin un gasto de energía. La energía necesaria para transportar un ion contra su propio gradiente electroquímico, proviene directamente de la hidrólisis del adenosíntrifosfato (ATP).⁽³⁾

LÍQUIDO EXTRACELULAR		LÍQUIDO INTRACELULAR	
Na ⁺ -----	142	mEq / L -----	10 mEq / L
K ⁺ -----	5	mEq / L -----	140 mEq / L
Ca ⁺⁺ -----	5	mEq / L -----	4 mEq / L
Mg ⁺⁺ -----	3	mEq / L -----	58 mEq / L
Cl ⁻ -----	100	mEq / L -----	4 mEq / L
HCO ₃ ⁻ -----	28	mEq / L -----	10 mEq / L
FOSFATOS -----	4	mEq / L -----	75 mEq / L
SO ₄ ²⁻ -----	1	mEq / L -----	2 mEq / L
GLUCOSA -----	90	mg por 100 -----	0 a 20 mg por 100
AMINOACIDOS ---	30	mg por 100 -----	200 mg por 100
COLESTEROL -----		g por 100 -----	2 a 95 g por 100
FOSFOLIPIDOS --	0.5		
GRASA NEUTRA -----			
PO ₂ -----	35 mm	mm Hg -----	20 mm Hg
PCO ₂ -----	46 mm	mm Hg -----	50 mm Hg
pH -----	7.4		7.0

NUCLEO

Figura 1.2. Composición química de los líquidos extracelular e intracelular.

El flujo de los iones a través de la membrana celular se realiza de la siguiente forma: la membrana celular tiene una permeabilidad ligera, pero definida para Na^+ , de manera que este ion tiende a difundirse de forma activa hacia afuera de la célula, contra su gradiente de concentración. La permeabilidad de la membrana para K^+ es mucho mayor que para Na^+ , en consecuencia, K^+ tiende a difundirse hacia afuera contra su gradiente de concentración. La concentración de Cl^- es mayor en el LEC que en el LIC. Por lo demás, Cl^- tiene un coeficiente de permeabilidad relativamente elevado; por lo tanto este ion tiende a difundirse de manera activa hacia el interior de la célula. Sin embargo el LIC contiene una concentración elevada de aniones (SO_4^{2-} y PO_4^{3-}) y de proteínas no difusibles. Por lo tanto, Cl^- difunde pasivamente siguiendo su gradiente electroquímico en descenso. La magnitud de los potenciales de los mamíferos puede variar entre -20 y -100 milivoltios.⁽³⁾ Se muestra en la figura 1.3 el proceso de difusión de los iones.

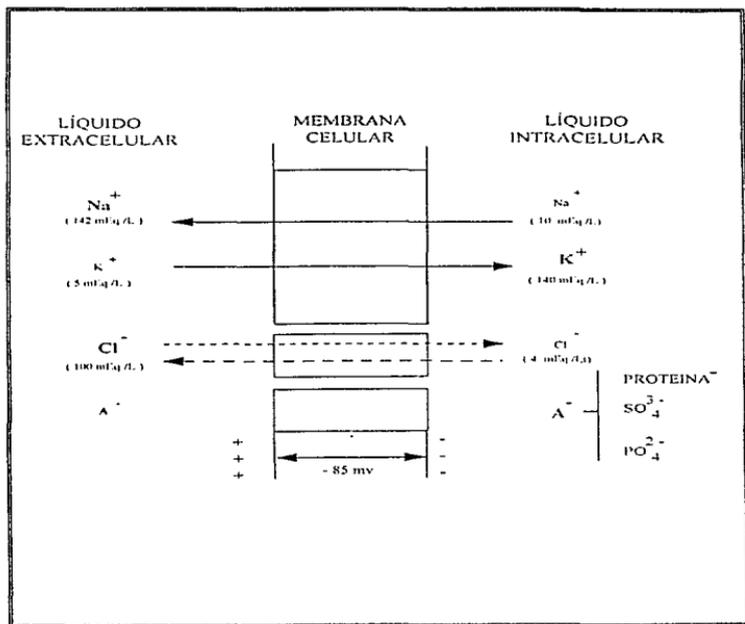


Figura. 1.3 Distribución de flujo de iones a través de la membrana celular.

CAPÍTULO II
SALIVA

SALIVA

2.1 Definición de saliva .

"La saliva humana es un fluido hipotónico formado por gran variedad de componentes orgánicos (proteínas y enzimas), inorgánicos (electrolitos) y sustancias no electrolíticas (urea, ácido úrico, glucosa, amoníaco, lípidos y colesterol).⁽⁴⁾

El término de saliva total se usa para describir la combinación de fluidos presentes en la cavidad bucal, los cuales actúan colectivamente para mantener la homeóstasis del medio ambiente bucal.⁽⁴⁾

2.2 Histología de las glándulas salivales.

Las glándulas salivales están compuestas en general por un sistema acinar y un sistema ductal. En el sistema acinar se produce de un 80 a 90 % las proteínas salivales, mientras que en el sistema ductal, se lleva acabo un recambio electrolítico, el cual convierte la saliva primaria (isotónica) en hipotónica, saliva que finalmente es excretada.^(4,5)

2.2.1 División por su tamaño.

Las glándulas se dividen en dos grupos principales:

a) Glándulas salivales mayores (Figura. 2.1):

- Parótida.
- Submandibulares.
- Sublinguales.

b) Glándulas salivales menores:

- Labiales.
- Palatinas.
- Bucales.
- Linguales.

2.2.2 División por su tipo de secreción.

a) *Mucosas*, éstas contienen sialomucina la cual sirve a los propósitos de lubricación, la encontramos en la glándulas del paladar y lengua.⁽⁵⁾

b) *Serosas*, contiene α -amilasa, esta enzima sirve para hidrolizar los almidones, la encontramos en la glándulas parótida y las glándulas linguales de Von Ebner.⁽⁵⁾

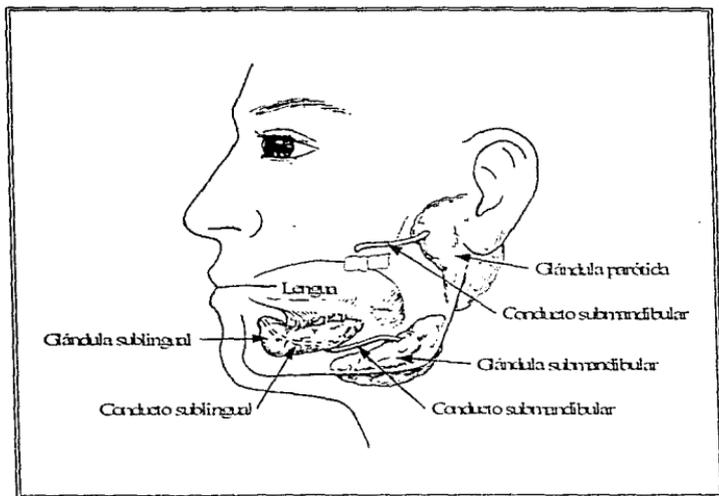


Figura 2.1 Esquema de las principales glándulas salivales.

c) *Mixtas*, las cuales tienen secreción mucosa y serosa, éstas las encontramos predominantemente en la glándula submandibular y sublingual.⁽⁵⁾

2.3 Formación y secreción de la saliva.

Este proceso se realiza en dos etapas. Los acinos producen una secreción primaria que contiene α -amilasa, sialomucina o ambas en una solución de iones cuya concentración es similar a el líquido plasmático (saliva primaria). Sin embargo, conforme la secreción primaria fluye por los conductos, se efectúan dos procesos activos de transporte que modifican intensamente la composición iónica salival.^(4,5)

Primero se reabsorben activamente los iones sodio en los conductos salivales y se secretan en forma activa iones potasio para intercambiar con el sodio. Por lo tanto, la concentración de sodio en la saliva se reduce en grado importante, mientras que la de potasio aumenta. El gran exceso de resorción de sodio en comparación con la secreción de potasio crea una negatividad en los conductos salivales y esto da lugar a la resorción pasiva de los iones cloruro, por lo que la concentración del ion cloruro decae a niveles muy bajos, proceso que acompaña a la disminución del ion sodio.⁽⁵⁾

En segundo lugar, el epitelio de los conductos secreta iones bicarbonatos hacia la luz del conducto. Esto se da en parte, por el intercambio de iones bicarbonato por cloruro (Figura 2.2).

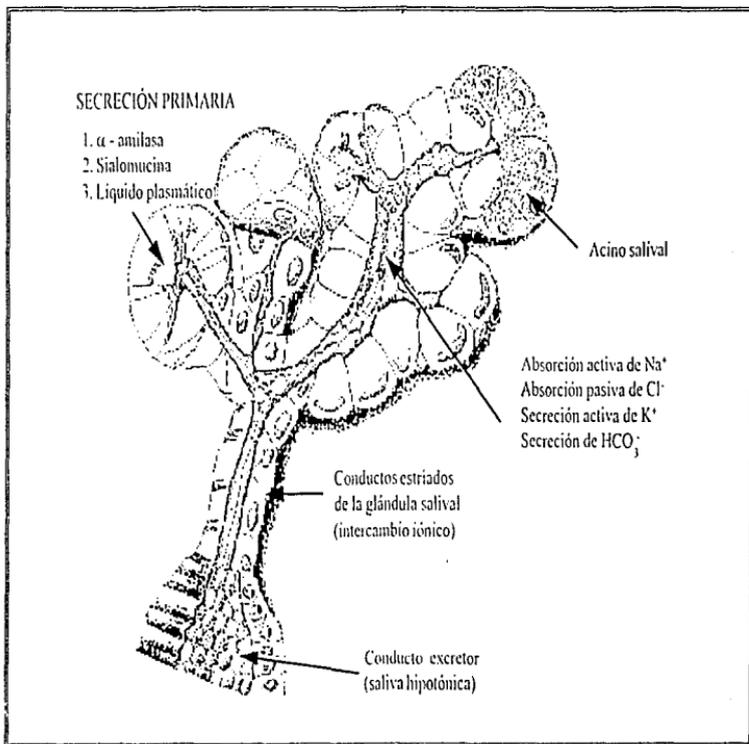


Figura 2.2 Esquema representativo de una glándula salival

Durante la salivación máxima, las concentraciones iónicas salivales cambian considerablemente, debido a que la velocidad de formación de secreciones primarias puede incrementarse hasta 20 veces. En consecuencia esta secreción fluye por los conductos con tal rapidez que se reduce considerablemente el reacondicionamiento de la secreción por los conductos. En el caso en que se excreten grandes cantidades de saliva, la concentración de sodio y cloruro se ven incrementadas.⁽⁵⁾

2.4 Características y funciones de la saliva.

2.4.1 Características físicas.

pH.	6.7 (5.6-7.6)
Densidad (g/mL).	1.01 - 1.02
Punto bajo de congelación (°C).	0.34 - 0.7

2.4.2 Flujo salival.

Las glándulas salivales participan en la economía de los fluidos y electrolitos del cuerpo. Está demostrado que la producción aproximada diaria de saliva es de 1 a 1.5 litros. Sin embargo, secreciones de 500 a 600 mL son más realistas y varían de acuerdo al tipo de secreción salival que se trate y al estímulo que se utiliza (psicomotor, gustativo, etc.).

En estado de reposo se observa que la glándula que aporta una mayor cantidad de saliva es la glándula submandibular (Tabla 2.1), y si se efectúa una estimulación la secreción de la glándula parótida puede ser mayor que la submandibular.^(4,5)

Contribución de cada glándula salival a la secreción diaria de saliva.	
	Volumen total
Glándula parótida	25 %
Glándula submandibular	71 %
Glándula sublingual	3-4 %
Glándulas menores	traza

Tabla 2.1 Porcentajes de saliva no estimulada.⁽⁴⁾

El flujo salival es función de muchos factores fisiológicos y característicos de cada individuo como son: la alimentación, el ritmo cardíaco, el clima, el efecto de la luz, la edad y el sexo, entre otros.⁽⁴⁾

2.5 Composición de la saliva humana.

La saliva está constituida por sustancias de diferentes pesos moleculares. Entre estos destacan electrolitos (Tabla 2.2), proteínas, enzimas y sustancias no electrolíticas: a todas se les considera como componentes importantes de secreción salival.⁽⁵⁾ Dentro de estos componentes salivales los electrolitos varían de acuerdo a ciertos factores como son: el pH salival, el ritmo cicardiano y el flujo salival.

El bicarbonato, cloro, sodio y potasio son constituyentes que también forman parte del plasma, otros cationes como son el calcio y magnesio se encuentran en bajas concentraciones y contribuyen a la osmolalidad del fluido. En el caso de calcio y fosfato, estos intervienen en la remineralización de la superficie de los dientes.⁽⁴⁾

Componente (mMol/L).	Parótida.	Submandibular.	Sublingual.	Plasma.
Potasio	21.0/24.0	17.0/14.4	13.2	4.0
Sodio	36.0/1.3	45.0/3.3	32.7	140.0
Cloro	28.0/22.0	25.0/12.0	26.2	105.0
Bicarbonato	15.0/0.5	16.0/ 2.0	5.4	13.0
Calcio	0.8/0.5	1.2/0.75	1.1	4.5
Magnesio	0.12/0.16	0.02/0.04	?	1.0
Fosfato	1.8/4.5	2.7/2.8	2.1	1.0

Tabla 2.2 Concentración de electrolitos en saliva no estimulada.⁽⁴⁾

Los componentes orgánicos en la saliva (proteínas, enzimas, lípidos y carbonatos) también juegan un papel importante en la cavidad bucal. En cuanto a las proteínas su concentración total depende del tipo de sujeto y del método utilizado para coleccionar la saliva. Los lípidos y proteínas dependen además del estado anímico y fisiológico del paciente así como de la actividad del mismo (Tabla 2.3).

Componentes mgr/100mL.	Parótida	Submandibular/ sublingual.	Plasma.
Proteína	221.0	132.0	7.0
Lípidos	8.0	8.0	600
Carbohidratos	31.0	15.0	100-140

Tabla 2.3 Concentración de componentes orgánicos en la saliva.⁽⁴⁾

2.6 Funciones biológicas de la saliva.

a) *Protección a los tejidos bucales*: algunos de los componentes tienen la cualidad de absorberse de manera muy selectiva al esmalte de los dientes. Esta adherencia depende de las propiedades fisicoquímicas que cada molécula posee particularmente. Dichas moléculas interactúan colectivamente para formar películas protectoras que ayudan a la lubricación, a la modulación de la adherencia microbiana, cuando se tiene un flujo regular de saliva.⁽⁴⁾

b) **Actividad antimicrobiana:** el ion tiocianato (SCN^-) y el peróxido de hidrógeno son usadas por la peroxidasa salival la cual inhibe el crecimiento bacteriano.⁽⁴⁾

c) **Digestión:** cabe mencionar que la saliva tiene un papel fundamental en la hidratación y dispersión de las partículas de la comida durante el proceso de masticación. Todo esto ayuda en la formación y lubricación del bolo alimenticio, favoreciendo así su paso por el esófago. Además la α -amilasa hidroliza el almidón favoreciendo el proceso pre-digestivo.⁽⁴⁾

d) **Capacidad amortiguadora (buffer):** el bicarbonato salival es el principal agente que contrarresta la acidez producida por los restos alimenticios. A valores bajos de pH en la saliva se reduce la disociación de grupos ácidos provocando no solo la proliferación de bacterias en la cavidad bucal, sino también los procesos de desmineralización dental. Componentes como la urea y el amoníaco así como ciertos péptidos básicos, contribuyen a neutralizar el pH natural.⁽⁴⁾

e) **Proceso de mineralización:** el esmalte dental esta formado por minerales relativamente insolubles (calcio-fosfato) mejor conocido como hidroxiapatita (HAP). Estos minerales se disuelven lentamente en saliva carente de componentes proteínicos. En condiciones homeostáticas adecuadas en la saliva los individuos no tienden a perder los dientes y si se encuentra el esmalte

descalcificado en una lesión cariosa temprana se remineraliza si la superficie del diente se limpia con regularidad y se encuentra en contacto con la saliva.⁽⁴⁾

2.7 Sialoquímica.

La saliva a través de su composición química (sialoquímica) ayuda a diagnosticar tanto enfermedades locales como sistémicas que no sólo afectan a las glándulas salivales, sino también permite la detección de enfermedades metabólicas, también resulta ser una gran ayuda en el monitoreo de sustancias ajenas al cuerpo humano. Este análisis se basa en determinar los cambios de concentración tanto en los constituyentes orgánicos como en los inorgánicos de la saliva, así como en la detección de sustancias ajenas a ella (medicamentos, drogas, contaminantes, etc.).⁽⁶⁾

Entre las aplicaciones más importantes de la sialoquímica se encuentran, el uso forense, para el monitoreo de fármacos (diasepán, cafeína, antibióticos, anticonvulsivos, etc.)⁽⁶⁾, y la determinación de varias hormonas (cortisol, progesterona, testosterona, etc.).

CAPÍTULO III
POLAROGRAFIA

POLAROGRAFÍA

Las técnicas polarográficas empezaron a desarrollarse apartir de los años 50's con la polararografía clásica, pero su difusión estuvo severamente impedida por el costo y las dificultades de la instrumentación. Con la revolución de la ciencia en el pasado decenio se lograron implementar otras técnicas polarográficas más sensibles como son: normal de pulsos, diferencial de pulsos, redisolución anódica y cronopotenciometría.⁽⁷⁾

3.1 Aplicaciones de la polarografía.

Se pueden llevar acabo determinaciones de especies orgánicas e inorgánicas, siempre y cuando se oxiden o se reduzcan en el dominio de electroactividad, esto es, el límite de la zona positiva fijada por la oxidación del mercurio y el de la zona negativa fijada por la reducción del electrolito soporte.

El método polarográfico se distingue especialmente por su rapidez, sensibilidad y precisión. Lo que hace un poco lento el proceso de la determinación es la preparación de la muestra, como ocurre generalmente en cualquier método de análisis instrumental.

A continuación se describen algunos campos de aplicación de este método.⁽⁸⁾

- a) En medicina y farmacia.
 - a.1) Análisis de sangre.
 - a.2) Análisis de orina.

- b) En la industria química.
 - b.1) Determinación de tetraetilo de plomo en gasolinas.
 - b.2) Determinación de azufre libre en petróleos.
 - b.3) Determinación de azufre libre en caucho vulcanizado.

- c) En el análisis de agua.
 - c.1) Determinación de oxígeno.
 - c.2) Determinación de benceno.
 - c.3) Determinación de plomo-tetraetilo.
 - c.4) Determinación de óxido nítrico.

- d) En el análisis de suelos.
 - d.1) Determinación de elementos alcalinos.
 - d.2) Determinación de hierro.
 - d.3) Determinación de cobre, zinc, manganeso y cadmio.

e) En el área de metalurgia.

En este campo con frecuencia se presenta el problema de la determinación de elementos en muy baja proporción frente a otros que están en gran cantidad especialmente en el caso de las aleaciones. La polarografía puede aplicarse en metalurgia desde el control de materias primas (minerales), hasta la especificación en el producto final.

3.2 Reacciones electroquímicas.

Las reacciones electroquímicas se caracterizan por la realización de una oxidación o reducción debida a la transferencia de electrones a través de una interfase metal-solución.

A las especies que son capaces de oxidarse o reducirse en la superficie del electrodo, es decir, son parte de una reacción electroquímica se les denomina especies electroactivas.⁽⁹⁾

Cuando se establece un equilibrio en un sistemas óxido-reducción:



Este equilibrio electroquímico se puede representar por la ecuación de Nernst:

$$E_{eq} = E^0 - \frac{0.0592}{n} \log \frac{[\text{red}]_i}{[\text{ox}]_i}$$

Donde E^0 es una constante característica del sistema redox considerado, 0.0592 es una constante que nos relaciona a la temperatura absoluta (293° K), a la constante de los gases (R) y a la constante de Faraday (F), los subíndices denotan actividades en la interfase del electrodo - solución.⁽⁹⁾

3.3 Tipos de electrodos.

Los electrodos pueden ser de varios tipos distintos:

a) *Electrodos de trabajo*: los cuales se les llama atacables cuando participan directamente en una reacción electroquímica e inatacables cuando sólo intercambian electrones con la solución.^(10,11)

b) *Electrodos de referencia*: tienen un potencial constante en la disolución y durante todo el proceso de electrólisis aún, ante el paso de pequeñas corrientes, deben proporcionar potenciales constantes.^(10,11)

c) *Electrodos auxiliares*: están constituidos por metales inertes principalmente platino y oro, el potencial que desarrollan depende únicamente del sistema óxido - reducción de la solución en la que están sumergido.^(10,11)

d) *Electrodos selectivos para iones*: también se conocen como electrodos de membrana que permite la cuantificación potenciométrica de varios iones, éstos

tienen un potencial proporcional al logaritmo de la concentración de ion a analizar (esta parte se ampliará posteriormente en potenciometría).^(10,12)

Para hacer análisis polarográfico es necesario utilizar una celda que contenga tres electrodos: electrodo de trabajo, referencia y auxiliar . En nuestro caso el electrodo de trabajo fue un EGM, el de referencia un electrodo de plata / cloruro de plata, y como electrodo auxiliar un electrodo de platino.

3.4 Formas de transporte.

El transporte de sustancias electroactivas de la solución a la interfase metal - solución se lleva a cabo por tres formas.

a) *Difusión*: la sustancia se mueve debido a la existencia de un gradiente de concentración entre dos puntos de la solución. Desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo (donde se transforma por la reacción que ahí se lleva a cabo).⁽⁸⁾

b) *Convección*: tiene lugar por un gran desplazamiento de la solución, ya sea por un gradiente térmico dentro de ella o por medio de agitación de la misma.⁽⁸⁾

c) *Migración*: se debe al efecto del campo eléctrico sobre los iones cargados.⁽⁸⁾

Lo esencial en polarografía es que la reacción esté controlada exclusivamente por la difusión de iones, las otras dos formas de transporte (convección y migración) deben ser mínimas. En la práctica, la convección se evita procurando que no exista agitación en la celda y que la temperatura de la misma sea uniforme; la migración eléctrica se evita colocando un electrolito concentrado o soporte (por lo menos 50 veces más concentrado que la sustancia problema), y que sea inerte al electrodo, es decir que su potencial sea mucho más alto que el intervalo normal de potenciales.^(8,10)

3.5 Electrodo de gota de mercurio (EGM).

3.5.1 Fabricación de un microelectrodo de gota de mercurio.

El modelo clásico utiliza un tubo capilar, generalmente de vidrio de diámetro exterior de 3 a 5 mm, diámetro interno de 0.05 a 0.7 mm, de longitud variable. Uno de los extremos del capilar está unido a un tubo de plástico flexible que llega a un depósito de mercurio.⁽¹⁰⁾

Debemos mantener constante la altura de la columna de mercurio para tener un mayor control en el tamaño de la gota, también se puede hacer caer la gota a diferentes tiempos, mediante un martillo que golpea el capilar.

Para el caso en que se aplica el análisis a iones metálicos o sustancias orgánicas, estas deben ser capaces de ser reducidas en el EGM, en un intervalo de +0.40 V a -3.0 V con respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE).⁽¹⁰⁾

La ventaja de utilizar el EGM es que, por efecto de las condiciones electrolíticas citadas, la gráfica de corriente frente al voltaje aplicado presenta una forma característica con una meseta o límite superior de corriente; a esta gráfica se le conoce como polarograma (Figura 3.1). A la corriente límite se le denomina corriente de difusión, que es función de la concentración de la especie electroactiva, y al potencial correspondiente a la mitad de esta corriente se le conoce como potencial de media onda ($E_{1/2}$), que es característico de cada especie.

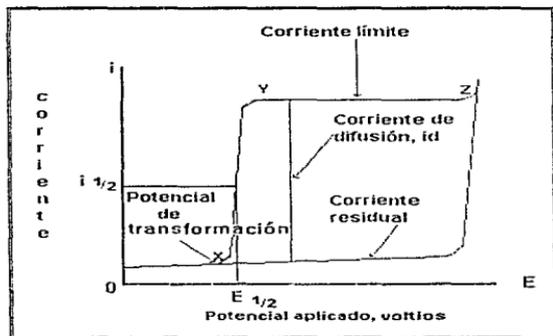


Figura 3.1 Polarograma característico Corriente Vs Voltaje (polarografía clásica).

La relación entre el potencial (E) y el correspondiente valor de la corriente (I), viene dada generalmente por la siguiente ecuación cuando este proceso es controlado por la difusión y es reversible:

$$E = E_{1/2} - \frac{0,059}{n} \log \frac{i}{i_d - i}$$

Esta es conocida como la ecuación fundamental de la polarografía. La relación entre la concentración de la especie y la corriente de difusión viene dada por la ecuación de Ilkovic:

$$i_d = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C$$

Donde n representa al número de electrones que interviene en la reacción; D es el coeficiente de difusión (cm²/seg); m el flujo de mercurio (mg/seg); t el tiempo de goteo (segundos) y C la concentración (mMol/L), a una temperatura de 25°C.⁽¹⁰⁾

3.5.2 Arreglo con tres electrodos.

Para que se lleve a cabo una electrólisis debe haber por lo menos dos electrodos, entre los cuales se impone un diferencia de potencial. Si hay paso de corriente, la diferencia de potencial aplicado a los electrodos es distinta al

potencial de la celda, debemos tomar en cuenta la caída óhmica de la celda comprendida entre los electrodos, la cual es el resultado del producto de la resistencia eléctrica de la solución (R) por la intensidad de corriente (I); por lo tanto la diferencia de potencial aplicada está dada por la siguiente ecuación:

$$E_{apl} = E_{ind} - E_{ECS} - IR$$

Donde E_{apl} corresponde al potencial aplicado a la celda, E_{ind} es proporcional al potencial aplicado, E_{ECS} es constante, IR es el término correspondiente a la caída óhmica. La razón por la que es necesario reducir o minimizar el término IR corresponde a que si R es grande, se requerirá una fracción cada vez mayor de E_{apl}

para superar la caída de IR . Caso contrario si IR es pequeña, el electrodo indicador reflejará la variación de E_{apl} en forma regular (Figura 3.2).⁽¹³⁾

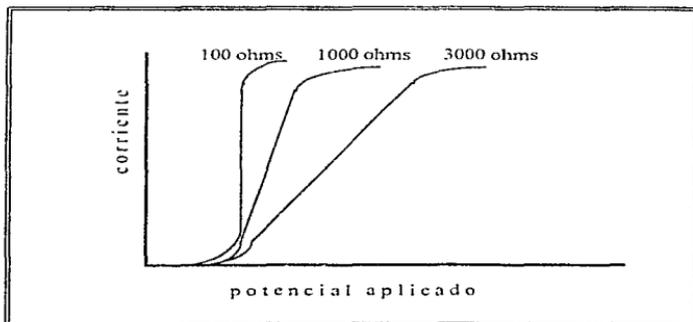


Figura 3.2 Efecto de la resistencia de la celda sobre la onda polarográfica.

Este efecto se disminuye de dos formas:

1.- Adicionando un electrolito soporte, cuya función, consiste en abatir el transporte de los iones por medio de migración, dejando así, que los iones en estudio se difundan desde el seno de la solución al electrodo, movidos únicamente por la difusión. La concentración de este electrolito debe estar presente por lo menos unas 50 veces mayor que la de los iones o sustancias a electrolizar.

2.- Se utiliza un montaje constituido por tres electrodos, en donde la electrólisis se lleva a cabo entre el electrodo de trabajo y el auxiliar (en este caso un alambre de platino). Así la corriente que circula entre ambos constituye la corriente de electrólisis (Figura 3.3).^(13,14)

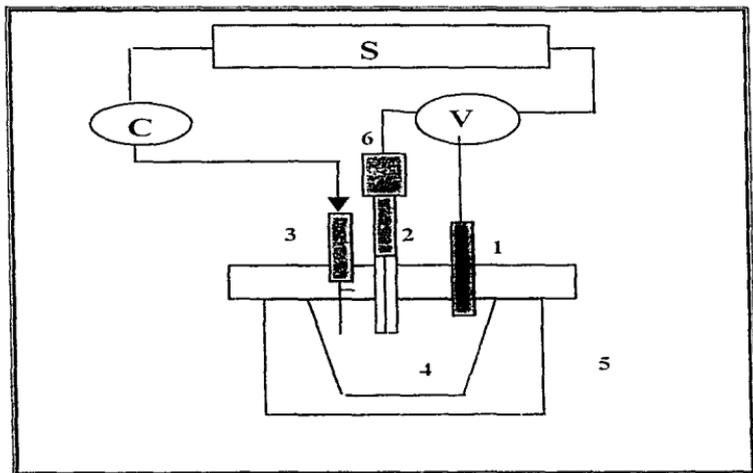


Figura 3.3 Circuito de electrólisis.⁽¹⁴⁾

S	Fuente de corriente.
C	Microamperímetro.
V	Milivoltímetro.
1	Electrodo de referencia.
2	Electrodo goteante de mercurio. " Electrodo de trabajo "
3	Electrodo auxiliar.
4	Solución a electrolizar.
5	Celda de electrólisis.

3.5.3 Ventajas y limitaciones del EGM.

a) *Ventajas*

- Tiene una superficie continuamente renovable, en donde no se producen fenómenos de envenenamiento del electrodo, y cada vez que aparece una nueva gota de mercurio se restablecen las condiciones iniciales.

- Tiene un gran sobre voltaje para la formación de iones hidrógeno, como consecuencia puede estudiarse la reducción de muchas especies.

- Alcanza inmediatamente corrientes medias reproducibles con cualquier potencial aplicado.

- Es posible determinar dos o más sustancias simultáneamente, basándose en la diferencia de potencial que existe entre, ellas mínimo 0.2 V.^(8,12)

- Los dominios más favorables se obtienen utilizando sales de cationes de amonio cuaternarias que permiten alcanzar aproximadamente -2.8 V/ECS.

b) *Limitaciones*

- La facilidad con que se oxida el mercurio restringe el uso del mercurio como ánodo.

- Siendo que el oxígeno es soluble en la mayor parte de los medios de trabajo, se observan ondas de reducción en medio acuoso.

3.6 Polarografía de pulsos.

La técnica de polarografía de pulsos superó a la polarografía clásica en sensibilidad, esto es, la relación entre la corriente farádica (proporcional a la concentración) y la corriente capacitiva es aproximadamente de 3 ordenes de magnitud al final de la vida de la gota de mercurio, lo cual, permite tener un limite de detección entre 10^{-7} y 10^{-10} Mol/dm³ dependiendo de la selección del pulso.⁽¹⁵⁾

3.6.1 Polarografía diferencial de pulsos.

Se aplica un potencial continuo que aumenta linealmente con el tiempo. Se obtiene una curva diferencial que consiste en un pico de corriente, la altura de este pico es directamente proporcional a la concentración de la especie.

El valor del pulso aplicado va desde 10 a 100 mV (amplitud del pulso) a intervalos regulares de 1 a 5 seg, la duración del pulso es de aproximadamente 60 mseg y termina con el desprendimiento de la gota de mercurio del electrodo. La corriente se mide en dos intervalos con una duración de 15 mseg, el primero antes del pulso y el segundo durante el pulso hacia el final de éste; la señal final es la diferencia de estos dos valores (Δi) (Figura 3.4). Para sincronizar el pulso con el goteo, se realiza este último desprendiendo la gota con una sacudida mecánica a tiempo controlado.^(15,15)

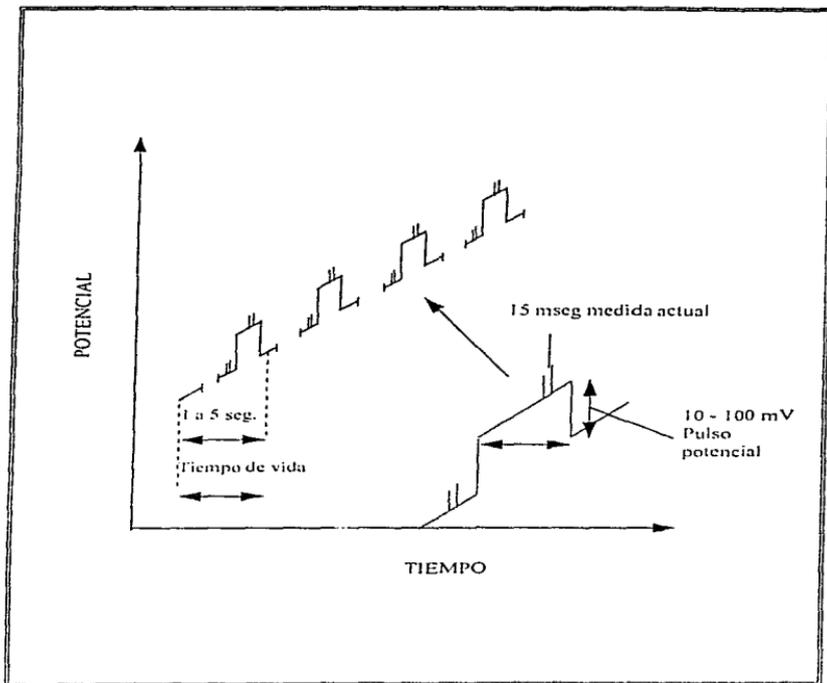


Figura 3.4 El perfil del pulso y medida actual en la polarografía diferencial de pulsos.

(Δi) representa la corriente durante la amplitud del pulso. Esta diferencia ocasiona que la corriente sea mas grande durante la parte ascendente de la onda polarográfica alrededor de $E_{1,2}$, donde un cambio pequeño de potencial representa un cambio grande en la corriente (Figura 3.5).

3.6.2 Polarografía normal de pulsos.

Probablemente uno de los problemas más grandes en polarografía es la adsorción de especies sobre la superficie del electrodo. Estas pueden distorsionar las formas de los picos de corriente. Esta distorsión se puede minimizar, colocando un potencial base a un valor tan bajo que ningún producto se forma.

La determinación hace que una cantidad pequeña del producto de electrólisis se forme durante la duración corta del pulso.

Esta técnica es un poco menos sensible que la diferencial de pulsos 10^{-7} Mol/dm³, pero tiene algunas ventajas muy distintas y esto es, la elección de la potencia de base a la cual el electrodo devuelve el pulso, esto es, el potencial base aplicado es continuo y no crece linealmente con el tiempo. La corriente capacitiva decae muy rápido, el pulso es más corto y más parejo de 15 mseg, cerca del fin del pulso la corriente capacitiva decae hasta la base de potencial. La señal total aplicada de voltaje, es una serie de pulsos, uno a cada reducción.

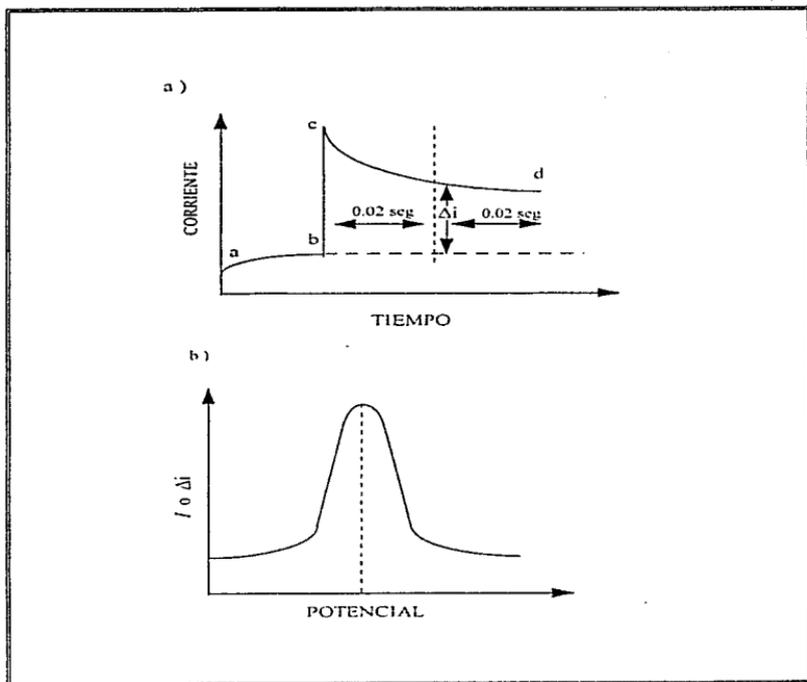


Figura 3.5 Gráfica a) Corriente - Tiempo y b) Corriente - Voltaje en polarografía normal de pulsos.

subiendo en una rampa lineal pero manteniendo la base potencial en cada pulso, la corriente es registrada al final de cada pulso (Figura 3.6). El polarograma resultante de corriente Vs. voltaje es similar al polarograma de polarografía clásica (Figura 3.7).⁽¹⁵⁾

3.7 Potenciometría.

Los métodos potenciométricos comprenden la medición directa de un potencial de electrodo, con lo cual se puede determinar la actividad (o la concentración cuando la reacción es rápida) de un ion activo. Las mediciones de la actividad de los iones determinan los equilibrios químicos, este mecanismo se puede describir adecuadamente por medio de la ley de Nersts clásica.⁽¹¹⁾

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}} = E^0 - \frac{0.059}{n} \log \frac{a_{red}}{a_{ox}}$$

La respuesta de los electrodos de ion-selectivo suele ser bastante lenta y debe emplearse mucho tiempo para establecer una lectura en equilibrio. La respuesta se hace más lenta al disminuir la concentración, por otra parte, algunos electrodos responden con suficiente rapidez y pueden emplearse para medir velocidades de reacción. Para nuestro caso en particular hablaremos del electrodo "sensible" al sodio, puede emplearse para determinar la actividad del

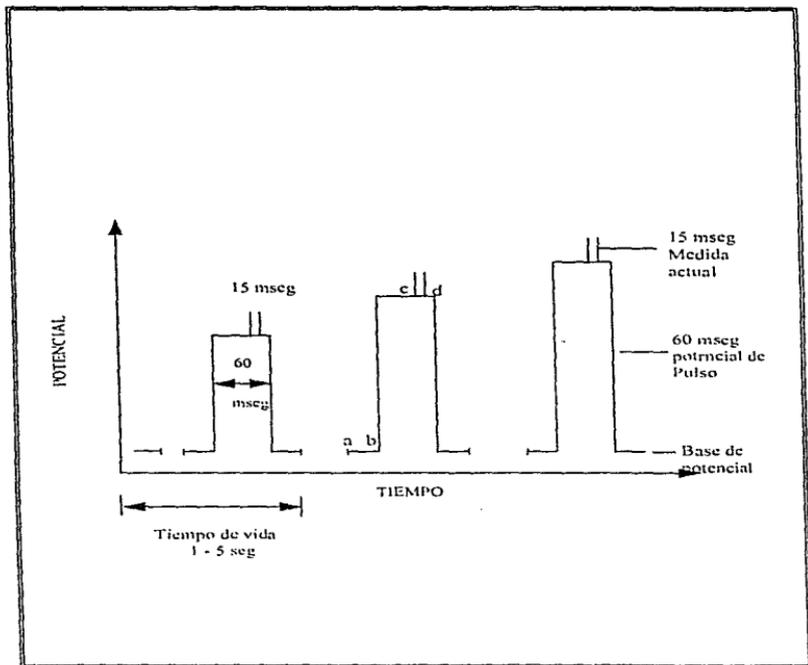


Figura 3.6 El perfil del pulso y medida actual en la polarografía normal de pulsos.

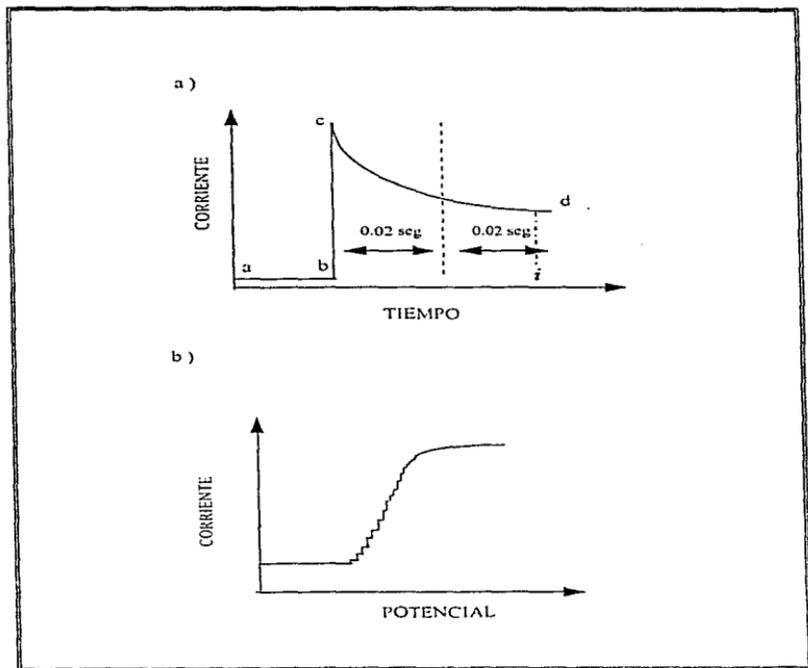


Figura 3.7 Gráfica a) Corriente - Tiempo y b) Corriente - Voltaje en polarografía normal de pulsos.

sodio en presencia de grandes cantidades de iones potasio. Su selectividad hacia el sodio con respecto al potasio es de 3000 o mayor, este es un electrodo de membrana del tipo sensible al catión.

3.7.1 Precauciones y limitaciones del electrodo de ion-selectivo.

- Mide las concentraciones de las especies ionizadas pero la formación de complejos disminuirá la concentración medida.

- Las características de la respuesta y la relación de selectividad de cada electrodo es diferente y puede cambiar con el tiempo.

Pese a estas limitaciones los electrodos de ion-selectivo son cada vez más importantes, porque permiten determinar selectivamente una sustancia y por tanto se puede usar directamente sobre la muestra la muestra a analizar.

CAPÍTULO IV

DESARROLLO EXPERIMENTAL

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Descripción del equipo.

Para estudiar los fenómenos electrolíticos se requiere un montaje que consiste en:

1.- Equipo para el EGM.

Se utiliza el modelo 174/70, marca EG&G PRINCETON APPLIED RESEARCH, que cuenta con:

- Equipo contador de gota.
- Bulbo de cristal de 125 mL donde se coloca el mercurio.
- Capilar de vidrio de 6 pulgadas.
- Manguera de plástico que conecta al bulbo con el capilar.
- Celda de 50 mL.
- Electrodo de Ag/AgCl y platino.
- Tubo de purga.
- Conexiones tipo caimán para conectar los electrodos al equipo contador de gota.

Este tipo de equipo controla el flujo de mercurio dependiendo de la altura en donde se coloque el bulbo con mercurio, el desprendimiento de la gota se realiza por medio de un golpe de martillo suficientemente fuerte para que esta se desprenda. Al caer la gota se inicia un nuevo ciclo en donde se llevan a cabo las mediciones. En la Figura 4.1 se muestra el arreglo del equipo.

2.- Potenciostato o analizador polarográfico: Modelo 174A, marca EG&G PRINCETON APPLIED RESEARCH CORPORATION. El instrumento es muy versátil y útil para polarografía cd sin muestreo y con muestreo, polarografía diferencial e integral de pulsos, voltametría de redisolución con impulsos directos y diferenciales.

3.- Graficador: Modelo OMNIGRAPHIC, marca HOUSTON INSTRUMENT. Al muestrear la corriente de la celda justo antes del desprendimiento de la gota, esta se almacena y se manda al graficador, el cuál registra una curva que representa la corriente pico que fluye durante el ciclo de vida de la gota, trazando así, el polarograma correspondiente.

4.- Potenciómetro: Modelo TO1 A, marca ORION RESEARCH, digital, con una incertidumbre de (+/-) 2 mV.

5.- Electrodo de ion-selectivo para sodio: marca ORION RESEARCH.

6.- Electrodo de platino: marca CORNING

4.2 Reactivos y material.

El laboratorio ya contaba con soluciones estándar preparadas de concentración de 1000 ppm de las siguientes especies:

Sodio (Na^+).

Potasio (K^+).

Calcio (Ca^{2+}).

Cloro (Cl^-).

Electrolitos soportes:

Se prepararon los siguientes electrolitos grado analítico.

Tetrafluoroborato de tetrabutilamonio [$(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$] 0.1 M

Nitrato de sodio [NaNO_3] 0.1 M

Material:

3 matraces volumétricos de 10 mL.

1 vaso de precipitado de 250 mL.

1 pipeta volumétrica de 10 mL.

1 pipeta de 1 mL.

Propipeta.

Pizetas.

Para la recolección de muestra:

Guantes de látex.

Tubos de polipropileno marca CORNING.

Ligas de látex.

4.3 Recolección y manejo de muestra.

La muestra se colectó en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología (UNAM) en el transcurso de la mañana. El método fue propuesto por Jorma O. Tenouvo.⁽¹⁷⁾

(1) Recolección salival.

-La muestra fue colectada de un paciente sano de 23 años, sexo masculino.

-Se le pidió al paciente, se colocara en una posición 90°.

-Se relajará durante 1 minuto.

-Se utiliza una liga de hule estéril, la cual el paciente la masticó 10 veces al inicio de cada minuto, durante 5 minutos, expectorando dentro de un tubo de polipropileno cada vez que se acumuló gran cantidad de saliva en el piso de la boca.

(2) Se colocó en hielo el tubo de polipropileno y se transportó al laboratorio para su análisis.

(3) Se tomaron 3 mL de la muestra y se prepararon 3 matraces volumétricos de 10 mL cada uno (limpios y enjuagados con agua desionizada), se colocó 1 mL de la muestra en cada vaso se llevó hasta el aforo con agua desionizada.

- (1) Graficador.
- (2) Potenciostato.
- (3) Soporte.
- (4) Celda de electrólisis.
- (5) Mangueras de hule.
- (6) Bulbo con mercurio.

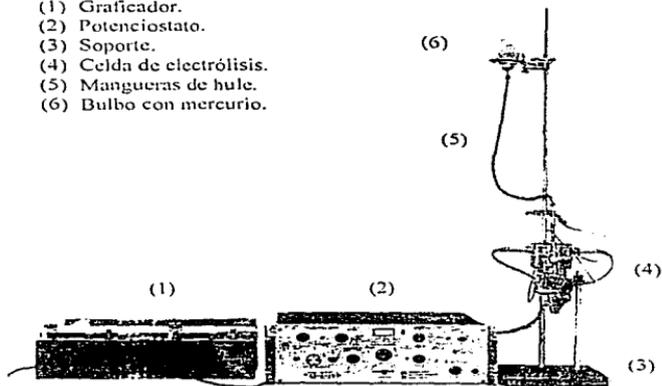


Figura 4.1 Montaje del equipo polarográfico.

4.4 Potencial de media onda.

Se muestran los potenciales de los electrolitos a determinar.

ELECTROLITO.	MEDIA REACCIÓN.	E ½ V contra ECS*
Sodio	$\text{Na}^+ + e^- \longrightarrow \text{Na}$	- 2.07
Potasio	$\text{K}^+ + e^- \longrightarrow \text{K}$	- 2.08
Calcio	$\text{Ca}^{2+} + 2e^- \longrightarrow \text{Ca}$	- 2.37
Cloro	$\text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2e^- \longrightarrow 2\text{Hg} + 2\text{Cl}^-$	+ 0.18

*Potenciales tomados del "CRS Handbook Series in Inorganic Electrochemistry" Louis Meites, Peter Zuman, CRS Press (1982).

4.5 Metodología.

La metodología consiste en tres etapas:

Primera etapa: (*Colección de la muestra.*)

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Journa O'Tenouvo, descrito anteriormente.

Segunda etapa: (*Preparación de la muestra.*)

Se tomó 1 mL de muestra y se llevó al aforo a 10 mL, con agua desionizada, se agitó y se mantuvo en hielo hasta antes de ser analizada, esto fue, para evitar la descomposición rápida de la muestra.

Tercera etapa: (*Trazo de los polarogramas.*)

Se trazó el polarograma de corriente residual y después se adicionó 1 mL de la muestra a la celda, se realizaron 3 polarogramas por muestra, lo cual nos da al final del desarrollo un total de nueve polarogramas, que posteriormente serán analizados.

ELECTROLITOS.	TÉCNICA UTILIZADA PARA SU DETERMINACIÓN.
Sodio	Potenciometría.
Potasio	Polarografía diferencial de pulsos.
Cloro	Polarografía diferencial de pulsos.
Calcio	Polarografía normal de pulsos.

A continuación se presentan en forma de diagramas de bloques el procedimiento para la determinación de los iones cloro, calcio, potasio y sodio.

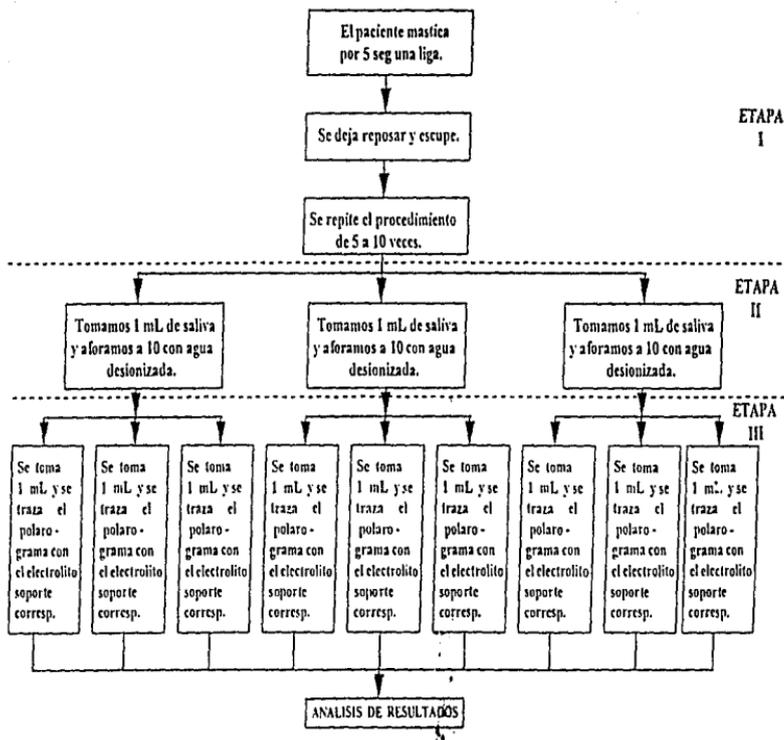


Diagrama de flujo para la determinación de los iones: potasio, cloro y calcio.

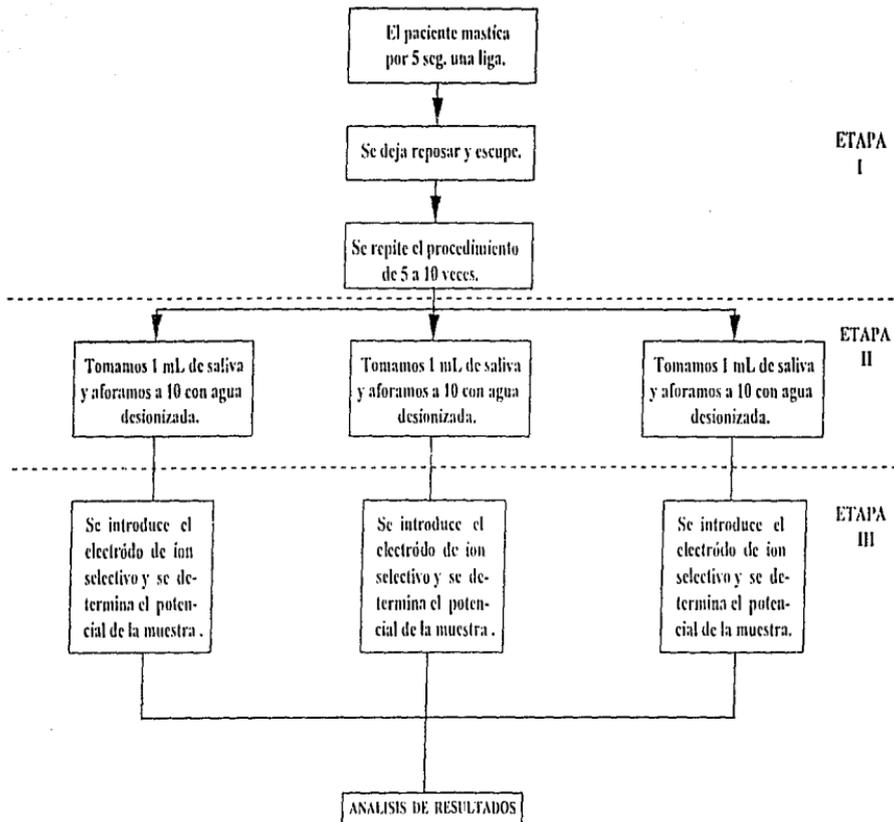


Diagrama de flujo para la determinación del ion sodio.

4.5.1 Curvas de calibración.

Se utilizó el método de curvas de calibración para determinar la concentración de los iones. Se trazaron las curvas de calibración para cada uno de los iones a determinar.

Primero se trazó el dominio de electroactividad del ion posteriormente se adicionó a la celda un volumen equivalente a la concentración del ion, de preferencia menor, por ejemplo, si el rango del ion en la saliva es de 2 a 3×10^{-3} M se hicieron adiciones de 1×10^{-3} M y se trazaron los 5 polarogramas. Los polarogramas obtenidos son Corriente Vs Potencial y conociendo la concentración de cada adición, se traza la gráfica de Altura de pico Vs Concentración.

Esta gráfica nos va a servir para cuantificar el ion a determinar en la muestra de saliva, en las mismas condiciones. Se mide la altura del polarograma de la muestra se lee en la curva de calibración, la concentración correspondiente a esta, será la concentración del ion en la muestra.

4.5.2 Determinación de Cloro (Cl⁻).

(1) Controles

Velocidad de barrido	5 mV/seg.
Dirección de barrido	negativa.
Potencial inicial	0.20 V contra Ag/AgCl.
Potencial final	- 0.7 V contra Ag/AgCl.
Sensibilidad	0.20 μ A.
Rango	1.5 V.
Modo de operación	Diferencial de pulsos

(2) Se agregaron 10 mL del electrolito soporte (NaNO₃) (0.1 M) y se burbujea 6 min. con N₂ gas.

(3) Se trazó el polarograma de corriente residual.

(4) Se volvió a burbujear N₂ por de 1/2 minuto.

(5) Se agregó 1 mL de la muestra (matraz 1) y se realizó un segundo trazo.

Se repitió desde el paso (2) hasta que se obtuvieron tres polarogramas de cada matraz.

4.5.3 Determinación de Calcio (Ca²⁺).

(1) Controles

Velocidad de barrido	5 mV/seg.
Dirección de barrido	negativa.
Potencial inicial	- 2.2 V contra Ag/AgCl.

Potencial final	- 2.4 V contra Ag/AgCl.
Sensibilidad	0.20 μ A.
Rango	1.5 V.
Modo de operación	Normas de Pulsos.

(2) Se agregan 10 mL del electrolito soporte [$(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$] 0.1 M y se burbujeó 6 min. con N_2 gas.

(3) Se trazó polarograma de corriente residual.

(4) Se volvió a burbujear N_2 por 1/2 minuto.

(5) Se agregó 1 mL de la muestra (matraz 1) y se realizó un segundo trazo.

Se repitió desde el paso (2) hasta que se obtuvieron tres polarogramas de cada matraz.

4.5.4 Determinación de Potasio (K^+).

Esta determinación presentó algunas variantes, porque los potenciales de sodio y potasio son muy parecidos, por lo tanto este resultado incluye en la altura del pico la cantidad de sodio más la cantidad de potasio. En el capítulo siguiente se explica como se cuantificaron cada uno.

(1) Controles

Velocidad de barrido	5 mV/seg.
Dirección de barrido	negativa.
Potencial inicial	- 1.8 V contra Ag/AgCl.

Potencial final	- 2.3 V contra Ag/AgCl.
Sensibilidad	0.50 μ A.
Rango	1.5 V.
Modo de operación	Diferencial de Pulsos.

- (2) Se agregaron 10 mL del electrolito soporte [$(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$] 0.1 M y se burbujea 6 min. con N_2 gas.
- (3) Se trazó polarograma de corriente residual.
- (4) Se volvió a burbujear N_2 por de 1/2 minuto.
- (5) Se agrega 1 mL de la muestra (matraz 1) y se realizó un segundo trazo. Se repitió desde el paso (2) hasta que se obtuvieron tres polarogramas de cada matraz.

4.5.5 Determinación de Sodio (Na^+).

- (1) Se prepararon 5 soluciones estándar de concentraciones 1×10^{-4} M, 2×10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 4×10^{-4} M y 5×10^{-4} M.
- (2) Se midió el potencial de cada solución con un electrodo selectivo de sodio, a temperatura ambiente, se dejó 2 minutos sumergido el electrodo en cada una de las soluciones.
- (3) Se midió el potencial de cada uno de los vasos de precipitado, en las condiciones anteriores.
- (4) Se anotaron todos los resultados.
- (5) Con los resultados anteriores se realizó la curva de calibración.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados de las curvas de calibración.

5.1.1 Cloro.

Primero se trazó el polarograma de corriente residual y después los polarogramas de la curva de calibración.

A continuación se trazó la gráfica de Altura de pico Vs Concentración y se ajustaron los puntos aplicando una regresión lineal. Resultados de la curva de calibración (la columna sombreada es el ajuste por regresión lineal):

Altura cm	Concentración Mol/L	Altura ajustada cm
0.00	0.00	0.12
2.00	5.00E-04	1.97
3.70	1.00E-03	3.82
6.00	1.50E-03	5.67
7.80	2.00E-03	7.51
9.00	2.50E-03	9.36

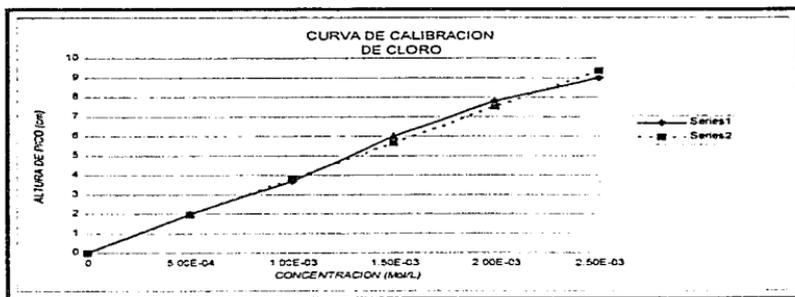
Ordena al origen = 0.12 cm

Pendiente = 3697.14 Mol / L cm

Factor de correlación = 0.9970

Como se observa al realizar la regresión, los valores obtenidos tienen un buen ajuste, lo que nos confirma que cada adición que se realizó fue proporcional a una altura determinada, por lo que ésta resultó ser una buena curva de calibración, siempre y cuando se trabaje a las condiciones en que se realizó la misma.

También observamos una ligera interferencia en nuestra ordenada al origen (esta no parte de cero cuando nosotros no aplicamos un potencial), puede deberse a la zona en que estamos trabajando (en los límites o muros del dominio de electroactividad), aun así podemos considerarla una buena aproximación.



Gráfica 5.1 Curva de calibración de cloruro utilizando (NaNO_3) (0.1 M) como electrolito soporte.

5.1.2 Calcio.

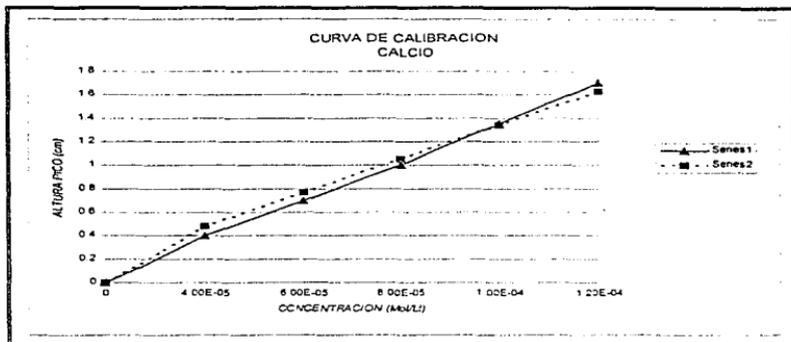
Para la determinación de calcio fue necesario cambiar la técnica de polarografía diferencial de pulsos a polarografía normal de pulsos. Este cambio se debió a la interferencia de sodio y potasio y también a que la diferencia entre los potenciales de potasio y calcio no es muy grande (de 0.20 V).

Para conocer el potencial donde teníamos que iniciar el trazo, fue necesario primero trazar varios polarogramas con muestra, aumentando siempre a cada polarograma 0.1 V, desde - 2.0 V hasta -2.3 V, seleccionando -2.2 V , debido a que en este potencial ya no detectamos presencia del ion potasio.

Resultados de la curva de calibración (la columna oscura nos muestra los valores ajustados por la regresión lineal).

Altura cm	Concentración Mol/L	Altura ajustada cm
0.00	0.00	-0.09
0.40	4.00E-05	0.48
0.70	6.00E-05	0.77
1.00	8.00E-05	1.06
1.35	1.00E-04	1.34
1.70	1.20E-04	1.63

Ordenada al origen = -0.09 cm
 Pendiente = 14321.42 Mol/L cm
 Factor de correlación = 0.9927



Gráfica 5.2 Curva de calibración de calcio utilizando $(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$ (0.1 M) como electrolito soporte.

Observamos que al trabajar con esta técnica, también se tiene una buena curva de calibración. Al igual que una pequeña corriente cuando no aplicamos un potencial, las causas pueden ser las mismas que las del ion cloruro, esto es, debido a que estamos trabajando en los límites del dominio de electroactividad.

5.1.3 Sodio.

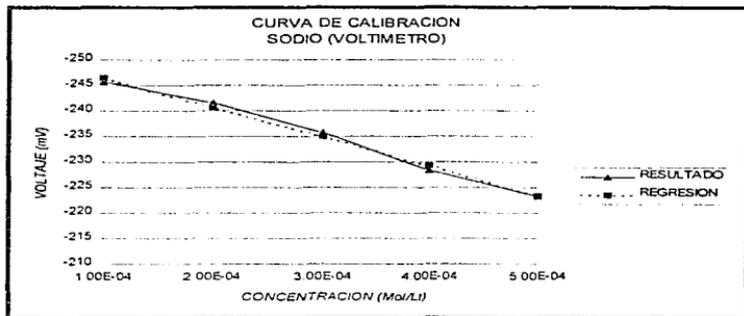
Debido a que el potencial de sodio y el de potasio son muy similares, fue necesario usar una técnica alternativa. Se contaba con un electrodo selectivo de sodio y con la ayuda de un potenciometro se trazó la curva de calibración de Voltaje Vs Concentración.

Para ésto se prepararon estándares de concentraciones conocidas y se determinó el potencial de cada una (los estándares utilizados se describen en la parte de metodología sección 4.4.5), se espero dos minutos para tomar la lectura debido a que ésta no se mantenía en un valor constante.

Resultados de curva de calibración por potenciometria (los valores sombreados son los ajustados por la regresión lineal):

Concentración Mol/L	Potencial mV	Potencial ajustado mV
1.00E-04	-245.7	-246.56
2.00E-04	-241.7	-240.77
3.00E-04	-235.7	-234.98
4.00E-04	-228.4	-229.19
5.00E-04	-223.4	-223.4

Ordenada al origen = - 252.35 mV
Pendiente = 57900 Mol/L mV
Factor de correlación = 0.9959



Gráfica 5.3 . Curva de calibración de sodio por potenciometría.

Se trazó también una curva de calibración por polarografía diferencial de pulsos, para ayudarnos a cuantificar al electrolito de potasio, ya que el polarograma para sodio o potasio mostraba la suma de los dos electrolitos.

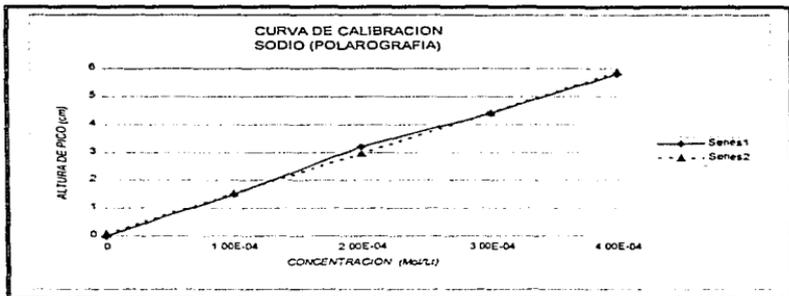
La curva de calibración de sodio por polarografía fue determinada igual que la de calcio y cloro, la parte oscura nos muestra la altura corregida por regresión lineal.

Altura cm	Concentración Mol/L	Altura ajustada cm
0.00	0.00	0.08
1.50	1.00E-04	1.61
3.20	2.00E-04	3.02
4.40	3.00E-04	4.43
5.80	4.00E-04	5.84

Ordenada al origen = 0.08 cm

Pendiente = 14500 Mol/L cm

Factor de correlación = 0.9985



Gráfica 5.4 Curva de calibración de sodio utilizando $(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$ (0.1 M) como electrolito soporte.

5.1.4 Potasio.

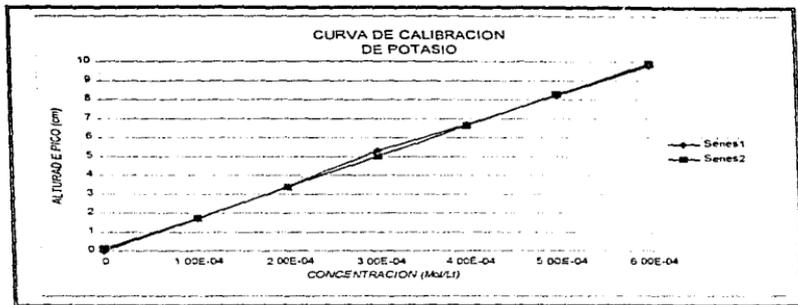
Para la realización de la curva de la calibración se utilizó la técnica conocida como polarografía diferencial de pulsos, y se trazó como se describe en la sección 4.5.1 de Desarrollo experimental.

Resultados de la curva de calibración (la parte sombreada corresponde al ajuste de los puntos, aplicando la regresión lineal).

Altura cm	Concentración Mol/L	Altura ajustada cm.
0.00	0.00	0.11
1.70	1.00E-04	1.74
3.40	2.00E-04	3.37
5.30	3.00E-04	5.90
6.70	4.00E-04	6.64
8.20	5.00E-04	8.27
9.80	6.00E-04	9.90

Ordenada al origen = 0.11 cm
 Pendiente = 16321.42 Mol /L cm
 Factor de correlación = 0.9999

Como se observa, en el factor de correlación, los valores obtenidos tienen un buen ajuste a un a línea recta.



Gráfica 5.5 Curva de calibración de potasio utilizando $(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$ (0.1 M) como electrolito soporte.

5.2 Resultados y discusión de resultados.

5.2.1 Cloro.

Se realizaron nueve determinaciones a las mismas condiciones de la muestra, y también se trazó la curva de calibración. La muestra fue tomada el día que se obtuvieron los resultados.

Los resultados fueron los siguientes:

Tipo de muestra: Total estimulada

Hora : 8:30 a.m.

Tubo utilizado: 030

Peso del tubo seco: 6.38 gr.

Peso del tubo con muestra: 12.60 gr.

Peso de la muestra: 6.22 gr.

Volumen de la muestra: 5.5 mL.

Corrida No.	Altura cm.	Concentración solución diluida Mol/L	Concentración de la muestra Mol/L
1	6.00	1.66E-03	1.82E-02
2	6.50	1.79E-03	1.97E-02
3	6.00	1.66E-03	1.82E-02
4	6.00	1.66E-03	1.82E-02
5	7.00	1.93E-03	2.12E-02
6	6.00	1.66E-03	1.82E-02
7	6.00	1.66E-03	1.82E-02
8	6.50	1.79E-03	1.97E-02
9	6.00	1.66E-03	1.82E-02

Análisis de datos :

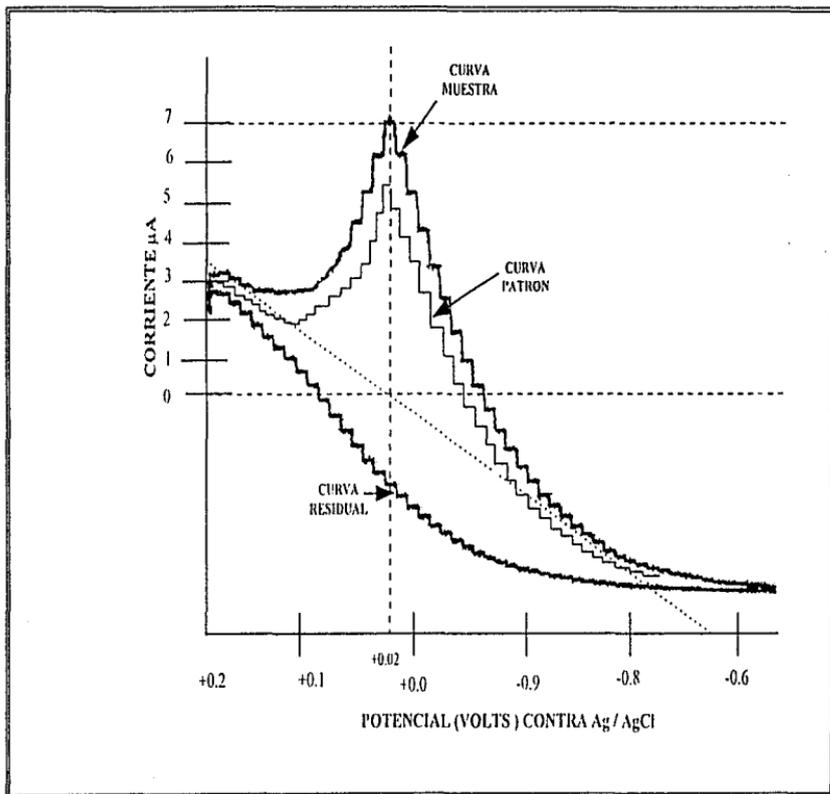
Promedio = 1.89E-2 Mol/L

Desviación estándar = 1.08E-3

Valor de t (95%, n-1) = 1.8595

Intervalo de confianza (Mol/L) = 1.82E-2 a 1.96E-2

El manejo de los resultados se realizó por medio de un análisis estadístico, conocido como t de student, para así conocer cuál es el intervalo de confianza de los mismos. En saliva la forma como se reporta la concentración es en



Polarograma 4.1 Determinación de cloruro utilizando como electrolito soporte $(\text{NaNO}_3)_3(0.1\text{M})$.

mMol/Lt, debido a las concentraciones tan pequeñas, así que haciendo la conversión tenemos que:

El intervalo de confianza para ion cloruro (mMol/L) = 18.2 a 19.6

El potencial del ion cloruro se vio desplazado hacia valores mas pequeños y este no concuerda con el potencial reportado en la pag. 35, el electrolito soporte y la temperatura con que trabajamos.

Una discusión más detallada sobre los resultados de todos los electrolitos se hará al final de este capítulo.

5.2.2 Calcio.

Se realizaron nueve determinaciones con una misma muestra de saliva, a las mismas condiciones de equipo y temperatura con las que se realizó la curva de calibración correspondiente. El criterio utilizado para tomar la lectura del polarograma fue a un centimetro sobre el eje de la X desde el punto inicial (se utilizó el mismo criterio para trazar la curva de calibración).

Los resultados fueron los siguientes:

Tipo de muestra: Total estimulada

Hora : 8:30 a.m.

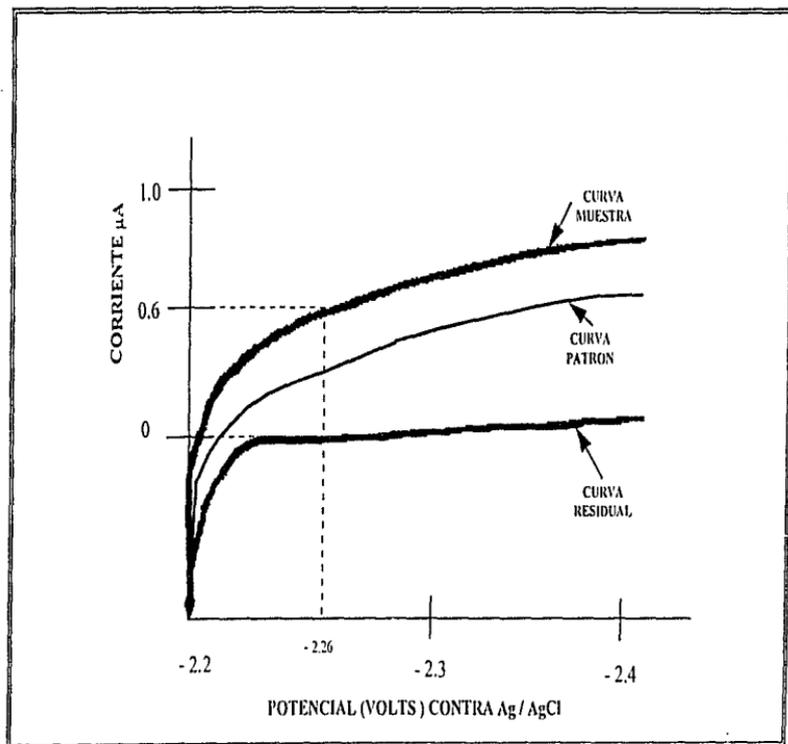
Tubo utilizado: 030

Peso del tubo seco: 6.38 gr.
 Peso del tubo con muestra: 12.63 gr.
 Peso de la muestra: 6.25 gr.
 Volumen de la muestra: 5.5 mL.

Corrida No.	Altura cm.	Concentración solución diluida Mol/L	Concentración de la muestra Mol/L
1	0.7	4.26E-05	4.61E-04
2	0.6	3.56E-05	3.92E-04
3	0.6	3.56E-05	3.92E-04
4	0.37	1.96E-05	2.15E-04
5	0.65	3.91E-05	4.30E-04
6	0.8	4.96E-05	5.45E-04
7	0.5	2.86E-05	3.15E-04
8	0.5	2.86E-05	3.15E-04
9	0.5	2.86E-05	3.15E-04

Análisis de datos :

Promedio = 3.76E-4 Mol/L
 Desviación estándar = 9.86E-5
 Valor de t (95%, n-1) = 1.8595



Polarograma 4.2 Determinación de calcio utilizando como electrolito soporte
[$(\text{TH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4$] (0.1 M).

Intervalo de confianza (Mol/L) = $3.15E-4$ a $4.37E-4$

Intervalo de confianza del ion calcio (mMol/L) = 0.315 a 0.437

Aunque el $E_{1/2}$ del ion calcio reportado es de -2.37 V en la literatura con respecto al ECS, se midió la altura de la corriente en -2.25 V. La concentración de calcio crecía proporcionalmente durante el intervalo de medición, esto nos permitió medir la altura en cualquier punto de potencial, pero siempre tomando el mismo punto para la curva de calibración y los polarogramas con muestra.

5.2.3 Sodio.

La concentración de sodio fue determinada con la ayuda de un electrodo de ion-selectivo para sodio. Para esto se determinó el potencial de sodio de las muestras y con la ayuda de la curva de calibración de Potencial Vs. Concentración se leyó la concentración correspondiente al potencial de la muestra de saliva ya preparada.

Los resultados fueron los siguientes:

Tipo de muestra: Total estimulada

Hora : 8:30 a.m.

Tubo utilizado: 025

Peso del tubo seco: 6.37 gr.

Peso del tubo con muestra: 12.84 gr.

Peso de la muestra: 6.47gr.

Volumen de la muestra : 6.5 mL

Potencial mV	Altura cm.	Concentración solución diluida Mol/L	Concentración de la muestra Mol/L
-243.7	2.40	1.60E-04	1.60E-03
-243.9	2.50	1.79E-04	1.79E-03
Promedio	2.45	1.70E-04	1.70E-03

Concentración promedio de la muestra = 1.70 mMol/L

Tomando en cuenta la incertidumbre que nos proporciona el equipo de (+-) 2 mV, tenemos un intervalo de concentración del ion sodio de : 1.56 a 1.85 mMol/L.

5.2.4 Potasio.

Potasio se tuvo que determinar indirectamente. Primero: fue necesario conocer la concentración de sodio y ver a que altura correspondía de acuerdo a la curva de calibración de sodio de Altura de pico Vs. Concentración por polarografía. Segundo: al polarograma trazado de sodio mas potasio se le resto la altura correspondiente a la concentración de sodio y la altura de la otra especie detectada, así la diferencia corresponde a la altura de potasio. Tercero: conociendo la altura de potasio se leyó en la curva de calibración de potasio Altura de pico Vs Concentración cuál era la concentración correspondiente de potasio para esa altura en la muestra de saliva.

Los resultados son los siguientes: Los datos del tipo de tubo utilizado y saliva corresponden a los mismos que se presentaron en los resultados de sodio, debido a que se utilizó la misma muestra de saliva para determinar los dos electrolitos.

Considerando los resultados de sodio:

Concentración : 1.46 mMol/L

Altura de pico : 2.6 cm.

Corrida No.	Altura total: cm.	Altura de Potasio cm.	Concentración solución diluida Mol/L	Concentración de la muestra Mol/L
1	10.10	4.3	2.57E-04	2.82E-03
2	9.70	3.9	2.32E-04	2.55E-03
3	9.50	3.7	2.20E-04	2.42E-03
4	9.30	3.5	2.08E-04	2.28E-03
5	9.90	4.1	2.44E-04	2.69E-03
6	9.50	3.7	2.20E-04	2.42E-03
7	9.60	3.8	2.20E-04	2.49E-03
8	9.10	3.3	1.95E-04	2.15E-03
9	9.00	3.2	1.89E-04	2.08E-03

Análisis de resultados :

Promedio = 2.43E-3 Mol/L

Desviación estándar = 2.41E-4

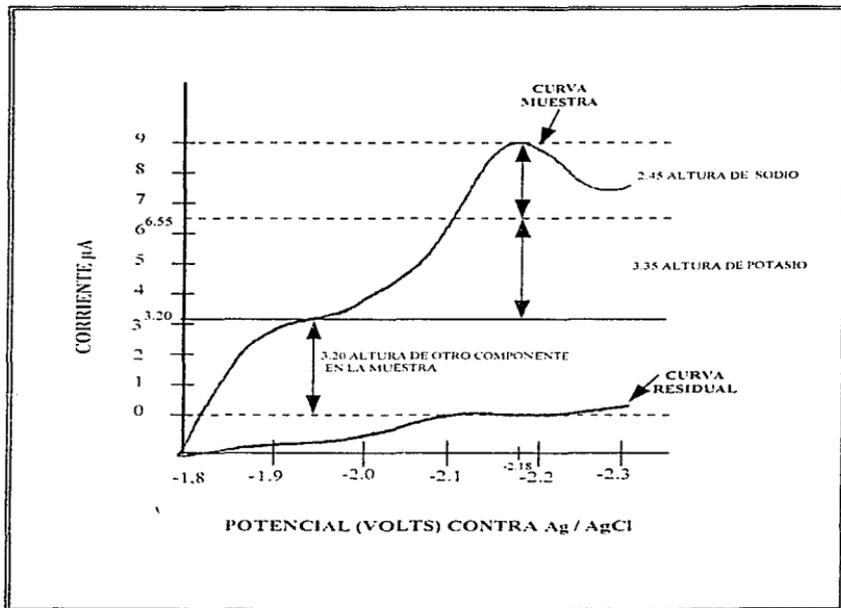
Valor de t (95%, n-1) = 1.8595

Intervalo de confianza (Mol/L) = 2.29E-3 a 2.58E-3

Reportando en las concentraciones apropiadas:

Intervalo de confianza del ion potasio (mMol/L) = 2.29 a 2.58

En este polarograma también observamos un desplazamiento de potencial hacia valores más negativos que los reportados, esto se puede deber al electrolito soporte y a la temperatura con que se trabajó.



Polarograma 4.3 Determinación de potasio utilizando como electrolito soporte $[(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3)_4\text{NBF}_4]$ (0.1 M).

5.3 Comparación de resultados

Se corroboraron los resultados obtenidos por la técnica propuesta por comparación con absorción atómica a excepción de cloro, el cual se determinó de acuerdo al Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater.⁽¹⁸⁾ También los resultados se compararon con otros estudios sobre sialoquímica realizados en Estados Unidos con referencia a la concentración electrolítica.

Los estudios realizados en el extranjero se hacen por medio de absorción atómica, aunque también tenemos que tomar en cuenta todos los factores que intervienen en estos estudios, como son: la altitud del lugar, temperatura ambiente, raza, condiciones del paciente como son: dieta, características genéticas y grado de nutrición principalmente.

ELECTROLITO mMol/L	TENOVO	GÓZALEZ Y COLS.	POLAROGRAFIA	ABSORCIÓN ATÓMICA
SODIO	13-80	16.2-18.06	1.56-1.85*	5.3
POTASIO	13-38	12.43-37.9	2.29-2.58	5.6
CLORO	10-56	20.06-26.4	18.2-19.6	18.3***
CALCIO	0.2-4.7	1.58-2.03	0.32-0.44	0.61

* sodio fue determinado por potenciometría.

** en el anexo A se presentan las bases de esta técnica.

*** el anexo B presenta la metodología para la determinación de cloro.

Al comparar los resultados por las dos técnicas (polarografía y absorción atómica), el cloro y calcio no presentan mucha diferencia entre las concentraciones reportadas corroborando así la exactitud del método para estos electrolitos. Del sodio y potasio no podemos decir lo mismo debido a que tuvimos que utilizar una técnica alternativa para cuantificarlos. las concentraciones de estos por las dos técnicas son distintas, esto puede deberse a que se tiene una mayor afinidad de las bacterias o proteínas por estos electrolitos. La dieta también es un factor importante principalmente cuando las muestra no son las mismas y esta dependerá de lo que hayamos consumido últimamente.

La diferencia entre los valores de calcio y cloro por las dos técnicas puede deberse a que no se utilizó la misma muestra para analizarse por ambas técnicas, debido a que en ese momento no era posible contar con los dos equipos. Así que una muestra de saliva tomada otro día se mandó a analizar al ININ (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares).

Al comparar los resultados con los obtenidos por González y Cols. son muy distintos a los obtenidos por polarografía (las concentraciones son menores en todos los electrolitos), esto se puede deber principalmente a las condiciones del lugar y paciente. Con Tenouvo tenemos que las concentraciones de calcio y cloruro están dentro de los límites que reportan, no así sodio y potasio.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones.

Esta tesis cumplió en parte favorablemente con su objetivo. Se demostró que utilizando el método polarográfico si se pueden cuantificar algunos iones como: Cl^- y Ca^{2+} , no así para K^+ y Na^+ en saliva humana.

Al comparar los resultados con otras observamos que estos son muy distintos entre ellos, como se mencionó anteriormente, no podemos decir que nuestros valores sean los reales, porque en ellos influyen muchos factores como son: la altitud, el clima, la dieta del paciente, la raza, genética de la persona.

Nuestros resultados polarográficos determinan que, la polarografía resulta ser una buena alternativa para cuantificar calcio y cloruro, esto lo comprobamos al compararlos contra la técnica de absorción atómica.

Por polarografía no se logró cuantificar sodio y potasio, los potenciales de éstos son tan similares que la técnica no es selectiva. Por lo tanto, esta técnica no es recomendable para estudiar a estos electrolitos en una misma muestra, al menos que uno de ellos pueda ser eliminado por otros medios.

Se logró detectar sin complicaciones calcio y cloruro con la respectiva técnica polarográfica, aparte de que los resultados de éstos no son tan distinto a los reportados por los otros investigadores.

La polarografía normal de pulsos resultó ser una buena alternativa para eliminar las interferencias de los iones de sodio y potasio y poder cuantificar así al ion calcio en la muestra.

Los cloruros se determinaron sin problema y se comprobó que no hubo una contribución ajena apreciable de cloruros por la solución salina del electrodo. Esto fue comprobado colocando al electrodo una membrana con solución amortiguadora de (NaNO_3 0.1 M).

Las concentraciones obtenidas de los electrolitos Cl^- , K^+ , Na^+ y Ca^{2+} fueron menores que las obtenidas en el extranjero, esto puede ser efecto a lo reportado en el estudio realizados por Banderas y Cols, en donde ellos encuentran que la cantidad de saliva en la población mexicana es menor a la excretada por poblaciones extranjeras.

En general los resultados obtenidos nos permiten concluir con éxito el primer estudio sobre cuantificación electrolítica salival con métodos electroquímicos como la polarografía en la población mexicana, jamás reportado.

ANEXO A

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectroscopía se basa en la medida de la absorción, emisión o fluorescencia de la radiación electromagnética por parte de átomos o iones elementales como K^+ , Mg^{2+} y Al^{3+} en un medio gaseoso. Los métodos atómicos se clasifican según el método de atomización proceso por el cual, los constituyentes de una solución se convierten en átomos o en iones elementales gaseosos. Se considera dentro de los métodos analíticos más selectivos y permite determinar unos 70 elementos de la tabla periódica. Estos son generalmente más sensibles y pueden utilizarse para determinar concentraciones de analito de partes por millón a partes por billón. La eficacia y reproducibilidad de la fase de atomización, determina en gran medida la sensibilidad, precisión y exactitud del método.

En la atomización de llama una solución acuosa de la muestra se dispersa o nebuliza en pequeñas gotitas, que se mezclan con los gases combustible y oxidante y son arrastrados hacia una mechero-quemador. La evaporación del disolvente se produce en la base de la llama, que se localiza justo encima del mechero o quemador. Las partículas sólidas finamente divididas resultantes, son arrastradas hacia la región situada en el centro de la llama, denominada como interior. En esta zona que es la parte más caliente de la llama, se disocian en iones o átomos elementales. Finalmente estos son conducidos hasta la parte más exterior del mechero o cono exterior, donde puede tener lugar la oxidación antes de que las partículas atomizadas se dispersen.

En la llama se obtienen espectros de emisión y absorción. Los espectros de emisión se registran situando el cono interior de la llama, frente a la rendija de entrada del monocromador y entonces se determina la señal de salida por medio de un detector, a medida que el espectro se registra.

Los espectros de emisión atómica consisten en una serie de líneas discretas, cuyas longitudes de ondas son únicas para cada elemento. La línea espectral procede de la excitación de los electrones externos del átomo - ya sea por la energía de una fuente de radiación o por la energía de una llama caliente-. La proporción de átomos excitados con respecto a los que no están excitados varía entre 2,000 y 3,000 °C.

La flama requiere que el analito se halle en solución para efectuar la nebulización, esto es. la química de vía húmeda necesaria para disolver la muestra en una matriz conveniente para cada método de flama es un factor importante en el proceso analítico. Es necesario no tener interferencia en la muestra, de lo contrario hay que eliminarlas o enmascararlas (acomplejarlas).

La metodología es la siguiente:

- 1.- Liberar al analito a la flama.
- 2.- Inducir las transiciones espectrales (de absorción o emisión) que se necesitan para la determinación del analito.
- 3.- Aislar las líneas espectrales que se requieren para el análisis.

4.- Detectar el incremento o decremento de la intensidad de la radiación en las líneas aisladas.

5.- Registrar estos datos de intensidad.

ANEXO B

DETERMINACIÓN DE CLORO

El ion cloruro se determinó como si se tratara una muestra de agua, el método utilizado se basa en titulaciones ajustando siempre el pH.

La técnica que se describe es de acuerdo a la utilizada en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para la determinación de cloruros.

Primero se toma una muestra y se diluye hasta tener 100 mL para que el contenido de cloruros sea aproximadamente de 10 mg, se agregan 10 mL de ácido nítrico (HNO_3) (0.1N) y el indicador (difenilcarbazon), inmediatamente la solución debe de ser color verde-azul. Si la solución presenta color verde solamente, entonces la solución tiene un pH abajo de 2.0. Si la muestra es de color azul tiene un pH arriba de 3.8. Posteriormente se titula con una solución de Nitrato de Mercurio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) (0.014 N) hasta un color rojo.

Para determinar el blanco, utilizamos una muestra de 100 mL de agua destilada que contiene 10 mg de Carbonato de Sodio NaHCO_3 y titulamos con una solución de Nitrato de Mercurio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) (0.014 N) hasta una color rojo, el cual nos indica el punto final.

Cálculos:

$$Cl = \frac{(A - B) * N * 35,450}{\text{mL de muestra}}$$

A= mL de titulante de muestra.

B = mL titulante de blanco

N = Normalidad $Hg(NO_3)_2$

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LÍQUIDOS Y ELECTROLITOS. Juha P. Kokko, Richard L. Tannen. Ed. Medica Panamericana (1988).
- (2) METABOLISMO ELECTROLÍTICO Y EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE. J. Montoliu. Ed. Deyma libros, S.A. (1994).
- (3) FISIOLÓGÍA. Dr. David Jensen. Ed. Interamericana (1979).
- (4) SALIVA Y CAVIDAD BUCAL. González M. y Cols. Práctica odontológica. 15, 6, (1994).
- (5) FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA. Arthur C. Guyton, Ed. Interamericana, 3ra. edición (1994).
- (6) THE SALIVARY SYSTEM, Leo M. Sreebny, CRC Press, Inc, Boca Ratón, Florida (1987).
- (7) MODERN POLAROGRAPHIC METHODS IN ANALITICAL CHEMICAL, A. M. Bond, Ed. Mc Graw-Hill (1980).

- (8) POLAROGRAFÍA, Huertas, Ed. Alhambra S.A. (1971).
- (9) LAS REACCIONES ELECTROQUÍMICAS, G.Charlot, M. J. Badoz-Lambling, Ed. Toray-Masson (1969).
- (10) ANÁLISIS INSTRUMENTAL, Douglas A. Skoog, 2da. Edición, Ed. Mc.Graw-Hill (1990).
- (11) MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS, Habort H. Willard, Linne L. Merrytt, Ed. Continental, 4ta. Edición (1978).
- (12) QUÍMICA ANALÍTICA GENERAL, Gaston Charlot, Tomo II, Ed. Toray-Masson (1975).
- (13) "PREPARACIÓN DE EQUIPO PARA TÉCNICAS POLAROGRAFICAS". Propuesta para la realización de un práctica elaborada para la materia de Materiales por A. Alamillo, M. Suarez, J. Campos.
- (14) PROPUESTA PARA VALORAR ÁCIDO NALÍDICO POR POLAROGRAFÍA CLÁSICA EN UNA FORMA FARMACÉUTICA, Enrique Rivera Toledano, Tesis Facultad de Química UNAM (1985).
- (15) POLAROGRAPHY AND OTHER VOLTAMETRIC METHODS, T. Riley, C. Walson, Analytical Chemistry Open Learn (R51).

(16) QUÍMICA ANALÍTICA, Gary D. Christian, 2da Edición, Ed. Limusa (1990).

(17) SALIVA HUMANA, Jorma O. Tenouvo, I,CR PRESS (1989).

(18) STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, Thirteenth Edition, American Public Health Association (1971).

Despacio sin darme cuenta..... "construí"

D. J **GRACIAS**