

152



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

MINIATURIZACIÓN, DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE
METODOLOGÍAS ELECTROANALÍTICAS Y ÓPTICAS PARA EL ÁREA DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ADRIAN DE SANTIAGO ZARATE



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Rebeca Ugalde Vargas
Vocal:	Prof. José Alejandro Baeza Reyes
Secretario:	Prof. Consuelo Ayala Mondragón
1er. suplente:	Prof. Georgina Margarita Maya Ruiz
2do. suplente:	Prof. Rosalinda Velázquez Salgado

Sitio donde se desarrolló el tema.

Laboratorio de Electroquímica Analítica. Investigación y Enseñanza Experimental.
Facultad de Química, Edif. A, 3er. piso. Laboratorio 3E-3F

Asesor:



Dr. José Alejandro Baeza Reyes

Sustentante:



Adrián de Santiago Zárate

Agradecimiento.

A la **Coordinación de Superación Académica** de la **Facultad de Química** de la UNAM por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis dentro del subprograma 127:

“Formación Básica en Investigación”

durante el periodo 2001-2002

CONTENIDO

Prólogo

Agradecimiento

Abreviaturas		Página
Introducción		1
Hipótesis		2
1	Micropotenciometría	2
1.1	Construcción de equipo	2
1.1.1	Construcción de la microbureta de 2 mL	2
1.1.2	Microsensor de Polianilina	4
1.1.2.1	Síntesis del electrodo de PA con pulso directo	4
1.1.3	Microelectrodo de referencia	5
1.1.4	Sistema de agitación magnética a microescala	6
1.1.5	Microelectrodos de POSAI, C° y Ag°	7
1.2	Potenciometría. Valoraciones potenciométricas	8
1.2.1	Calibración del electrodo de PA como electrodo de pH	8
1.2.2	Titulación de HCl con NaOH titulado	10
1.2.2.1	Titulación de HCl por monitoreo micropotenciométrico del pH	10
1.2.3	Titulación de glicina con NaOH. Determinación de pK_{a1} y pK_{a2}	13
1.2.4	Control de la pureza de Ácido Acetilsalicílico, materia prima	16
1.2.5	Valoraciones volumétricas en medio no acuso. Determinación de la pureza de metronidazol, materia prima	17
1.2.5.1	Calibración del electrodo de POSAI	21
1.2.5.2	Titulación de $HClO_4$ 0.1F en AcOH	23
1.2.5.3	Determinación de la pureza de metronidazol, materia prima	24
1.2.6	Valoraciones volumétricas con reacciones de óxido-reducción. Determinación del contenido de $FeSO_4$ en tabletas.	25
1.2.6.1	Definición del parámetro adimensional p_e	25
1.2.6.2	Titulación de $K_2Cr_2O_7$ (Patrón secundario) con Sal de Mohr (Patrón primario)	26
1.2.6.3	Determinación del contenido de $FeSO_4$ en tabletas, producto terminado	28

1.2.7	Valoraciones volumétricas con reacciones de precipitación. Determinación de NaCl en Solución Salina Isotónica	29
1.2.7.1	Titulación de AgNO ₃ (Patrón secundario) con NaCl (Patrón primario)	29
1.2.7.2	Determinación de NaCl en Solución Salina Isotónica	32
1.2.8	Valoraciones volumétricas con reacciones de formación de complejos. Determinación de la dureza total de agua potable	34
1.2.8.1	Titulación de Na ₂ H ₂ Y 0.01 F (Patrón secundario) con Zn (II) (Patrón primario)	35
1.2.8.2	Titulación de Na ₂ H ₂ Y 0.01 F (Patrón secundario) con CaCO ₃ (Patrón primario)	35
1.2.8.3	Determinación de la dureza total de agua mediante valoración volumétrica con Na ₂ H ₂ Y 0.02 F titulado y monitoreo con indicador visual NET-NaCl	38
1.2.9	Valoraciones bifásicas a microescala. Determinación del contenido de Bromhidrato de Dextrometorfano en cápsulas de liberación prolongada	39
1.2.9.1	Valoración de HB ⁺ SRef en medios monofásico y bifásico	40
1.2.9.2	Determinación de HB ⁺ en cápsulas de liberación prolongada en medios monofásico y bifásico	43
1.2.10	Determinación de la Capacidad de Intercambio de resinas de intercambio iónico de tipo R-H fuerte con monitoreo micropotenciométrico	44
1.2.10.1	Equilibrios de distribución en resinas de intercambio iónico. Resinas de intercambio iónico. Capacidad de Intercambio. Efecto del ión común	44
1.2.10.2	Determinación de la Ci de una resina de tipo R-H fuerte. Monitoreo por indicador visual	46
1.2.10.3	Determinación de la Ci de una resina de tipo R-H fuerte. Monitoreo micropotenciométrico	46
1.3	Potenciometría. Valoraciones por curva de calibración	48
1.3.1	Determinación de cloruros en suero	48
1.3.1.1	Importancia clínica de los cloruros. Enfoques de laboratorio	48
1.3.1.2	Determinación de cloruros en el laboratorio clínico	49
1.3.1.3	Construcción del electrodo selectivo para cloruros	50
1.3.1.4	Determinación de cloruros en suero. Técnica operatoria: Potenciometría (i=0). Metodología analítica: Curva de calibración $E=f(pCl)$	51

1.3.2	Determinación de glucosa en suero	53
1.3.2.1	Importancia de la determinación de glucosa. Enfoques de laboratorio	53
1.3.2.1.1	Glucosa	53
1.3.2.1.2	Desordenes en el metabolismo de carbohidratos. Diabetes	54
1.3.2.1.3	Enfoques de laboratorio en la determinación de glu	57
1.3.2.2	Métodos de determinación de glucosa	59
1.3.2.3	Uso de glucosa oxidasa como elemento bioselectivo	60
1.3.2.4	Determinación de glu en suero. Técnica operatoria: Potenciometría ($i=0$). Metodología analítica: Curva de calibración $E=f(\text{pglu})$	61
2	Microconductimetría	64
2.1	Construcción de equipo	64
2.1.1	Microcelda conductimétrica	64
2.1.2	Interfase conductimétrica	64
2.2	Valoraciones conductimétricas	65
2.2.1	Titulación de HCl con NaOH titulado	65
2.2.1.1	Titulación de NaOH con monitoreo microconductimétrico	65
2.2.1.2	Titulación de HCl con NaOH titulado por monitoreo microconductimétrico	66
2.2.2	Determinación de AAS por valoración volumétrica por monitoreo microconductimétrico	68
2.2.3	Determinación de alcaloides totales (en forma de Nicotina) en cigarrillos por valoración microconductimétrica en medio no acuoso	69
2.2.3.1	Valoración de Nicotinamida, SRef. como modelo de la determinación de alcaloides totales con monitoreo microconductimétrico. Titulación de HClO_4 0.01F con monitoreo microconductimétrico	69
2.2.3.2	Extracción de alcaloides totales a partir de tabaco	71
2.2.3.3	Determinación de alcaloides totales (en forma de Nicotina) en cigarrillos por valoración microconductimétrica en medio no acuoso	71
2.2.4	Control de la conductividad de agua para uso no potable	74
2.2.4.1	Calibración de la celda microconductimétrica	74
2.2.4.2	Medición de la conductividad en muestras de agua	75
3	Microcronoamperometría y Micopolarografía. Voltamperometría cíclica	76
3.1	Construcción de equipo	76
3.1.1	Micopolarógrafo de Mínima Instrumentación (Minimal Instrumentation Micropolarograph, M.I.M.P.)	76

3.1.2	Microcelda electroquímica de tres electrodos	76
3.1.3	Electrodo Goteante de Mercurio	77
3.2	Cronoamperometria	78
3.2.1	Determinación de Ácido Ascórbico en tabletas efervescentes	78
3.2.1.1	Nociones básicas de cronoamperometria	78
3.2.1.2	Propiedades generales del Ácido Ascórbico	79
3.2.1.3	Establecimiento de los parámetros electroquímicos para la determinación de H_2Red en tabletas efervescentes	82
3.2.1.4	Determinación de H_2Red en tabletas efervescentes. Técnica operatoria: Cronoamperometria en RDP a E impuesto. Metodología analítica. Curvas de calibración $i=f(C_{H_2Red})$	83
3.2.1.5	Determinación de H_2Red en tabletas efervescentes. Técnica operatoria: Cronoamperometria en RDP a E impuesto. Metodología analítica. Adiciones estándar	85
3.2.2	Determinación de agua en medios orgánicos anhidros por el método del Karl-Fischer	88
3.2.2.1	Métodos para la determinación del contenido de agua	88
3.2.2.2	Determinación de agua por reacción de Karl Fischer	90
3.2.2.3	Solución de Karl Fischer	91
3.2.2.4	Técnicas para el monitoreo del punto final de la reacción de valoración	92
3.2.2.5	Construcción de equipo para valoración Karl Fischer	94
3.2.2.6	Reacción de Karl Fischer. Monitoreo micropotenciométrico ($i=0$)	94
3.2.2.7	Reacción de Karl Fischer. Monitoreo microconductimétrico	97
3.2.2.8	Reacción de Karl Fischer. Monitoreo microamperométrico	98
3.2.2.9	Determinación de agua en Acetonitrilo por el método de Karl Fischer con monitoreo microamperométrico	102
3.2.3	Determinación de glu en suero con electrodo de pasta de carbono/GOD	104
3.2.3.1	Construcción del electrodo de trabajo: GOD/Carbono/Nujol	104
3.2.3.2	Determinación de glu en suero. Técnica operatoria: cronoamperometria en RDP a E impuesto. Metodología analítica: Curva de calibración $i=f(C_{glu})$	105
3.3	Polarografía	107
3.3.1	Determinación de Ácido Nalidixico en tabletas	107
3.3.1.1	Nociones básicas de polarografía	107

3.3.1.2	Propiedades generales del Ácido Nalidíxico	109
3.3.1.3	Establecimiento de los parámetros electroquímicos para la determinación de ANX en tabletas	110
3.3.1.4	Determinación de ANX en tabletas. Técnica operatoria: Polarografía clásica. Metodología analítica. Adiciones estándar	112
3.4	Voltamperometría Cíclica	114
3.4.1	Determinación cualitativa de la actividad de GOD	114
3.4.1.1	Nociones básicas de Voltamperometría Cíclica	114
3.4.1.2	Determinación de la actividad de GOD	116
3.4.2	Determinación de glu en suero en presencia de GOD por VC	118
3.4.2.1	Determinación de glu en suero por Voltamperometría Cíclica	118
4	Microfotolorimetría	121
4.1	Introducción a los métodos ópticos de análisis	121
4.1.1	Naturaleza de la luz. Interacción luz-materia	121
4.1.2	Colorimetría, Fotolorimetría y Espectrofotometría	122
4.2	Construcción de equipo para microfotolorimetría y su funcionamiento	123
4.2.1	Microfotolorímetro	123
4.2.2	Definición del parámetro adimensional ρT y su determinación experimental	124
4.2.2.1	Definición del parámetro ρT por medición de $(R-R_s)/k = (I_i)$	124
4.2.2.2	Determinación experimental del parámetro ρT	126
4.3	Determinación de Hemoglobina en sangre total	129
4.3.1	Características generales de la hemoglobina	129
4.3.2	Importancia de la determinación de Hemoglobina. Enfoques de laboratorio	131
4.3.3	Principio de la determinación de Hemoglobina	133
4.3.4	Determinación de Hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina. Técnica operatoria: Fotolorimetría de absorción en el VIS. Metodología analítica: Curva de calibración	136
	$\rho T = f(C_{mHbCN})$	

Conclusiones		140
Referencias		141
Anexo 1	Microbureta de 2 mL	151
Anexo 2	Microagitador magnético y microelectrodos	152
Anexo 3	Microoscilador conductimétrico	153
Anexo 4	Microcelda para valoración Karl Fischer	154
Anexo 5	Microfotocolorímetro	155

PROLOGO

Algunos de los resultados presentados en esta tesis han sido puestos a discusión y prueba en los siguientes foros académicos:

XVII Congreso Nacional de Educación Química

Oaxaca, Oaxaca. Noviembre de 1998

"La docencia de la Química Analítica a Microescala: Escalamiento de las valoraciones ácido-base. Estudio teórico"

16ª Conferencia de Química

Santiago de Cuba, Cuba. Diciembre de 1999

"A novel teaching strategy in analytical chemistry: Low cost microscale titration potentiometric equipment"

XIV Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica.

Oaxaca, Oaxaca. Mayo de 2000

"Diseño y caracterización de un microelectrodo polimérico de pH"

1ª Conferencia Internacional de Química.

Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Diciembre de 2000

"Low cost micropotentiometric, conductimetric and photocalorimetric equipment in instrumental analysis"

"Design and characterization of microreference electrodes"

"Electroanalytical characterization of a pH sensor based on conducting polymer films"

XVI Congreso Nacional de Química Analítica.

Querétaro, Querétaro. Agosto de 2001

"Determinación del pH en acetonitrilo con electrodos miniaturizados a base de polímero conductor"

"Micropolarógrafo de Mínima Instrumentación (M.I.M.P.)"

"Caracterización de un microelectrodo miniaturizado de pH no membranal a base de un polímero conductor"

"Valoraciones micropotenciométricas y microconductimétricas"

"Microescalamiento de métodos ópticos de análisis"

XXV Congreso Latinoamericano de Química.

"Electroquímica analítica integral a microescala"

Taller de actualización "Microescalamiento en Química Analítica"

Facultad de Química, U.N.A.M. Enero de 1999

Taller Nacional de Electroquímica a Microescala

Centro Nacional de Química a Microescala. UIA Campus Santa Fe. Noviembre de 1999

Curso de actualización "Operaciones Analíticas de Valoración con Instrumentación a Microescala"

FES-Zaragoza. Campus II U.N.A.M. Enero de 2001

Taller de actualización "Química Analítica a Microescala"

Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas

Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Octubre de 2001

Taller Nacional de Electroquímica a Microescala

Centro Nacional de Química a Microescala. UIA Campus Santa Fe. Noviembre de 2002

Cursos de laboratorio de:

Química Analítica I

Química Analítica II

Química Analítica III

Química Analítica Instrumental I

de las carreras de Química, Química Farmacéutico Biológica y Química de Alimentos, así como la materia de.

Laboratorio de Control y Desarrollo Analítico

de la carrera de Química; todos desde 2000.

Abreviaturas

F	Formal, Formalidad. (mol/L)
VC	Voltamperometria Cíclica
PA	Polianilina
mL	mili Litro; unidad de volumen
v	Volumen
s	Segundo; unidad de tiempo
mV	mili Voltios, Unidad de potencial
E _{ref}	Electrodo de referencia
E _T	Electrodo de Trabajo
E _{aux}	Electrodo auxiliar
gly	Glicina
V _{p.f.}	Volumen de punto final
E _{PA}	Electrodo de Polianilina
Evidrio	Electrodo de vidrio para pH
R.A.	Reactivo Analítico (99.7% de pureza)
F.E.U.M.	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
AcOH	Ácido Acético Glacial
CV	Cristal Violeta
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
E	Potencial
DPA	Difenilamina
S.S.I.	Solución Salina Isotónica
NOM	Norma Oficial Mexicana
Y ⁴⁻	Ácido Etilendiamino Tetracético
NET	Eriocromo Negro T
AmBS	Ammonium Buffer Solution; Solución Amortiguadora de Amoniaco pH=9.2
P.M.	Peso Molecular
p.p.m.	Partes por Millón
HB ⁺	Bromhidrato de Dextrometorfano
CHCl ₃	Cloroformo
MIBK	Metil-isobutilcetona
SRef	Sustancia de Referencia

C	Capacidad de intercambio de una resina
C.V.	Coefficiente de variación estadístico
S.D.	Standard Deviation; Desviación estándar
g	gramo; unidad de masa
mg	mili gramo; unidad de masa
m	masa
r.p.m.	Revoluciones por Minuto
S	Siemens, unidad de Conductancia
μS	micro Siemens
κ	Conductividad
ψ	R_o/R_i donde R = respuesta medida
M.I.M.P.	Minimal Instrumentation Micropolarograph; Micropolarógrafo de Mínima Instrumentación
EGM	Electrodo Goteante de Mercurio
H ₂ Red	Ácido Ascórbico
AAS	Ácido Acetilsalicílico
BSE	Buffered Support Electrolyte; Solución-Electrólito Soporte Amortiguada KNO ₃ /Biftalato de potasio pH=4.0
RDP	Régimen de Difusión Pura
A	Amperio; unidad de corriente
μA	Micro amperios
i	Corriente
i	Valor Absoluto de corriente
i _{res}	Corriente residual
A	Área del electrodo
V	Volumen de solución
n	Número de electrones
i _{dl}	Corriente límite de difusión
D _i	Coefficiente de difusión de la i-ésima especie
C _i	Concentración de la i-ésima especie
t	Tiempo
τ	Tiempo de muestreo
mmol	mili mol; 10 ⁻³ mol; cantidad de sustancia
Kg	Kilogramo; 1000 gramos; 10 ³ gramos; unidad de masa
ISE	Ion Selective Electrode; Electrodo ión-selectivo

UV	Ultravioleta; Región del espectro electromagnético
DNA	Deoxiribonucleic Acid; Ácido Desoxiribonucleico
SCE	Saturated-Calomel Electrode; Electrodo de Calomel Saturado
glu	Glucosa; $C_6H_{12}O_6$
GOD	Glucosa Oxidasa
HK	Hexocinasa
ATP	Adenosin Trifosfato ó Trifosfato de adenosina
Da	Dalton; unidad de peso molecular de proteínas; un Da equivale al peso atómico del Hidrógeno.
Sx	Síndrome; conjunto de signos y síntomas
Dx	Diagnóstico
DMID	Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente, o Diabetes tipo I
DMNID	Diabetes Mellitus No Insulino-Dependiente, o Diabetes tipo II
HHNC	Hiperglycemic Hiperosmolar Nonketotic Coma; Coma No Cetosico Hiperglucémico Hiperosmolar
PBS	Phosphate Buffered Solution; Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
KFS	Karl Fischer Solution; Solución de Karl Fischer
Pyr	Piridina
MeOH	Metanol
$Na_2Tart \cdot 2H_2O$	Tartrato de sodio dihidratado
CP	Carbón Paste, Pasta de carbono
c.b.p.	Cuanto baste para
RDC	Régimen de Difusión Convectiva
AN	Acetonitrilo
VIS	Visible; región del espectro electromagnético
λ	Longitud de onda
Hb	Hemoglobina
I_0	Intensidad de luz monocromada emitida
I	Intensidad de la luz posterior a la incidencia
$[i]$	Concentración del i-ésimo analito
l	Longitud de paso óptico
R	Respuesta del detector
R_r	Respuesta residual o debida a la luz parásita
R_i	Respuesta a la disolución del i-ésimo analito
T	Transmitancia

$\rho T, A$	Absorbancia; $-\log T$
AmBS	Ammonia Buffered Solution; Solución amortiguadora de amoniaco pH=9.2
λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorción
mHb	Metahemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
mHbCN	Cianometahemoglobina
nm	Nanometro; 10^9 m

INTRODUCCIÓN.

La Química a microescala en el campo docente ha tenido un desarrollo muy vigoroso en las áreas de la Química General y de la Química Sintética (orgánica e inorgánica) para mostrar la reactividad de diversos sistemas de interés básico, ambiental, industrial, etc. con un gran impacto en las disminuciones de costos, tiempos de operación y residuos.

Por el contrario, el microescalamiento en Química Analítica se ha desarrollado ampliamente en Investigación y Desarrollo Analítico desde la época de los años cincuenta tanto en electroquímica analítica como en espectrofotometría y sobre todo en los métodos de separación cromatográficos. La miniaturización de la tecnología electrónica permitió diseñar aparatos, instrumentos y sistemas cada vez más pequeños con la consecuente disminución de cantidades de muestras complejas.

Las reacciones químicas cuantitativas en conjunto con el uso de indicadores coloridos permiten realizar valoraciones a nivel microescala. Sin embargo no es suficiente ilustrar el principio de las valoraciones volumétricas. La química moderna nace con el análisis químico de Lavoisier y se consolida con la instrumentación por lo que es necesario introducir actividades de medición instrumental y "el arte de la calibración" en la labor docente a microescala como complemento natural al uso de la balanza y de las reacciones coloridas.

La instrumentación analítica para trabajo analítico profesional es muy cara sobre todo si es a nivel miniaturizado para trabajo de monitoreo o para realizar mediciones *in situ* por lo que su acceso a los laboratorios docentes es muy caro.

Este trabajo presenta los resultados y las discusiones de los mismos sobre las siguientes técnicas analíticas:

1. Micropotenciometría.
2. Microconductimetría.
3. Microamperometría.
4. Micropolarografía.
5. Microfotocolorimetría.

Las técnicas antes mencionadas son aplicadas a muestras farmacéuticas, fluidos biológicos y en el estudio de algunos analitos de interés fármaco-biológico. Se exponen los resultados de diversas determinaciones usando equipo de bajo costo fabricado en condiciones de laboratorio.

Hipótesis.

Los análisis instrumentales realizados en condiciones de microescalamiento y con equipo fabricado en condiciones de laboratorio no presentan diferencia significativa a aquellos realizados con instrumentación convencional.

1. Micropotenciometría.

1.1 Construcción de equipo.

1.1.1. Construcción de la microbureta de 2 mL.

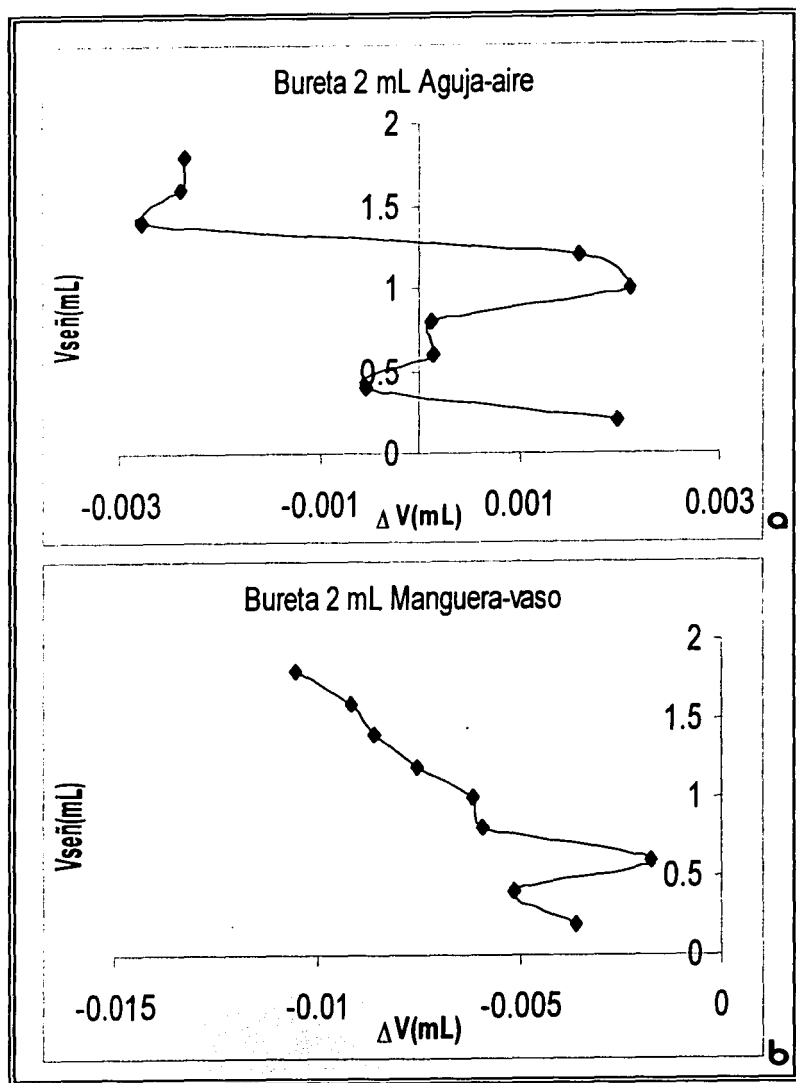
Se construyó una microbureta con capacidad total de 2 mL. El material utilizado para ello fue:

- a) Pipeta serológica de 2 mL 1/100.
- b) Llave de tres vías para venoclisis.
- c) Aguja hipodérmica calibre 21.
- d) Acrílico de 2.0 mm de espesor.
- e) Dos cinchos de plástico para cables tamaño chico.
- f) Pegamento Kola-Loka®
- g) Taladro con microbrocas para uso electrónico.

La microbureta construida se presenta en el anexo I.

La calibración de la bureta se realizó según las especificaciones hechas por Kreshkov et. al.¹¹ y las cartas de corrección de volúmenes para la microbureta se presentan en la gráfica I.

En la gráfica I se presentan dos variantes. La gráfica **a** representa la microbureta de 2 mL cuya punta es una aguja de jeringa de calibre 21, la cual no está tocando las paredes del recipiente donde se recibe el agua. En la gráfica **b** se presenta la misma bureta, pero la aguja ha sido sustituida por una manguera de venoclisis, cuyo extremo terminal está en contacto con las paredes del recipiente contenedor.



Gráfica 1. Cartas de corrección de buretas para la microbureta fabricada en condiciones de laboratorio de volumen de 2.0 mL. Se presentan tanto la variación de la punta que mostró la mejor precisión (a), así como la de menor precisión (b).

1.1.2. Microsensor de Polianilina.

La determinación potenciométrica del pH se realiza convencionalmente utilizando el electrodo combinado de vidrio. Pero, éste tiene la desventaja de ser frágil y costoso, además de que se requieren de volúmenes de solución grandes para poder utilizarlo. Ahora se propone el uso de polímeros conductores electrosintetizados, potenciostáticamente como sensores de pH. En este trabajo se utilizará el polímero de anilina, o sea, Polianilina (PA) como elemento sensor a la actividad del ion H^+ , en otras palabras, como sensor de pH. Se han descrito y caracterizado tres modos de electrosintetizar la PA [2], en este caso se utilizará la PA electrosintetizada sobre una barra de carbón-grafito por medio de un pulso directo de potencial de una batería convencional de 9V. Para comprobar la eficiencia del electrodo sintetizado por éste método, P. Diaz [2] reportó la comparación de este electrodo con otro sintetizado por Voltamperometría Cíclica (VC), método por el cual demostró la mejor repuesta frente al cambio de pH.

1.1.2.1 Síntesis del electrodo de PA con pulso directo.

El medio de reacción para la síntesis es Bisulfato de anilinio 0.1 F en H_2SO_4 0.1 F. Se colocó el polo positivo de la batería a una barra de grafito, que es polo donde se lleva a cabo la síntesis y el electrodeposición del polímero formado; en el polo negativo se colocó otra barra de carbón, cuyo fin es cerrar el circuito. Ambas barras de carbón se sumergieron en la solución antes mencionada durante 25 s. En la figura 1 se muestra esquemáticamente el sistema de electrosíntesis y depositación de la PA sobre la barra de carbón-grafito.

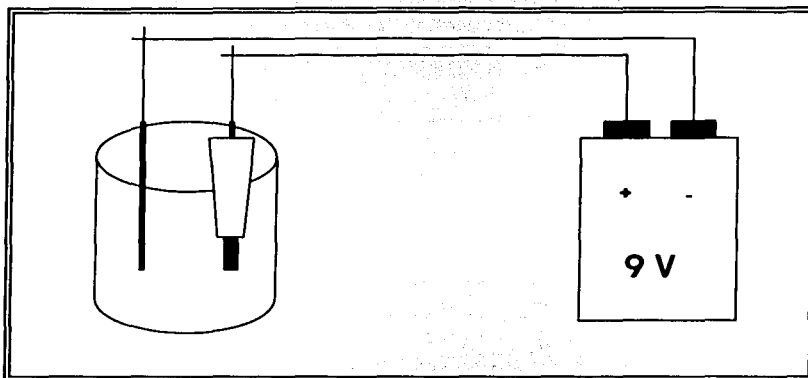


Figura 1. Representación esquemática de la síntesis potenciostática del electrodo de PA. La barra de carbono donde ocurrirá el depósito está soportada dentro de una punta de plástico para pipeta automática acondicionada al tamaño de la misma.

1.1.3. Microelectrodo de referencia.

El microelectrodo de referencia (E_{ref}) construido fue $Cu|Cu(II)||$. Al igual que el electrodo de PA, éste electrodo está soportado dentro de una punta de plástico para pipeta automática. El material de que está hecho es alambre de cobre comercial sin recubrimiento calibre 20 inmerso en una solución de $Cu(NO_3)_2$ 0.1F separados del analito por un tapón de algodón. La representación esquemática del microelectrodo de referencia de $Cu|Cu(II)||$ se encuentra en la figura 2.

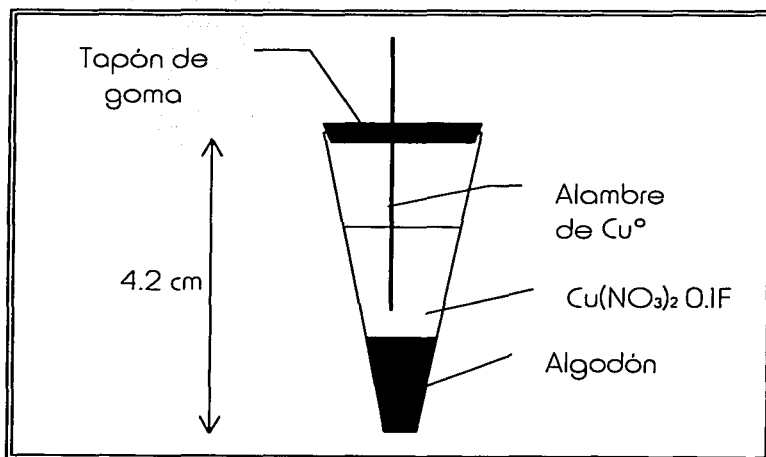


Figura 2. Representación esquemática del E_{ref} $Cu^0|Cu(II)||$. Se muestran cada uno de los componentes del mismo.

1.1.4. Sistema de agitación magnética microescala.

Es bien sabido que los agitadores magnéticos comerciales tienden a tener muchas veces costos excesivos. En el presente trabajo había dos razones para diseñar y construir un microagitador magnético. La primera de ellas era la dificultad que presenta el tamaño de los agitadores magnéticos convencionales, ya que están diseñados para el uso de matraces de capacidades mayores a 25 mL en la mayor parte de los casos, así como al uso de barras de agitación magnética grandes (convencionales). La segunda razón es el costo de los agitadores comerciales, recordemos que un objetivo de este trabajo es la reducción de costos que implica el uso de la química a microescala, por lo tanto, al construir los agitadores magnéticos en condiciones de laboratorio y con material accesible, se minimizan los costos totales. El material necesario para construir el microagitador magnético es:

- a) Caja de plástico
- b) Ventilador para CPU (Proam)
- c) Agitador magnético convencional de teflón.
- d) Madera balsa.
- e) Pegamento Kola-Loka®
- f) Juego de resistencias en serie cerámica con resistencia total de 130 Ω
- i) Un switch de apagado/encendido
- j) Una batería de 9V.
- k) Cautín y soldadura.

En el anexo I se muestra el microagitador magnético construido.

Por otro lado, a pesar de que existen barras de agitación magnética de teflón comerciales, se diseñaron y construyeron microbarras de agitación magnética del tamaño adecuado al material de vidrio utilizado en éste trabajo, pero utilizando material de bajo costo y de fácil acceso. El material necesario para construir la microbarra de agitación magnética es:

- a) Clips
- b) Capilares de vidrio.
- c) Lámpara de alcohol.

En la figura 3 se representa esquemáticamente la microbarra de agitación construida para éste trabajo. La microbarra de agitación magnética consta de un fragmento de clip dentro de un capilar cerrado en uno de sus extremos con el calor de una flama. Una vez que el clip está dentro, se cierra el capilar por el otro extremo nuevamente con calor. De este modo, se obtiene una microbarra de agitación cerrada y que impide la difusión de soluciones al interior de la misma. Es evidente que la longitud de la barra de agitación se puede elegir durante su fabricación. La longitud frecuentemente usada se especifica en figura 3.

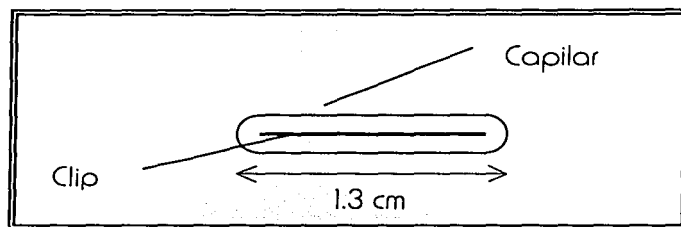


Figura 3. Representación esquemática de una microbarra de agitación magnética

1.1.5. Microelectrodos de POSAI, C° y Ag°

a) Microelectrodo de POSAI.

En 1988, K. Nomura y Y. Ujihira^[3] reportaron que las capas de óxido sobre acero inoxidable tienen la propiedad de ser sensores al pH. Con este antecedente, se fabricaron 6 sensores de Película de Óxido Sobre Acero Inoxidable (POSAI). Para la fabricación de los electrodos de POSAI^[4] se colocó un trozo de alambre de acero inoxidable de 7 cm de longitud dentro de una solución de CrO_3 2.5 F en H_2SO_4 5F; éste sistema se mantuvo a una temperatura en el intervalo de $75^\circ C < 80^\circ C$, durante 90 minutos en baño de María. Al finalizar el tiempo, los nuevos POSAI's se enjuagaron con agua destilada.

La calibración del electrodo de POSAI se realiza del mismo modo que en los electrodos de PA, la cual se detalla más adelante. Cabe mencionar que en el presente trabajo se utilizará el electrodo de POSAI para medios no acuosos. El E_{ref} sigue siendo el de $Cu|Cu(II)|$.

b) Microelectrodo de carbono (C°).

Este microelectrodo consta de una mina de carbono de tipo HB dentro de un soporte de punta para pipeta automática. En esencia, es el mismo electrodo de PA, pero sin recubrimiento de polímero. En la parte final del electrodo se colocó una capa de pegamento, con el fin de mantener el electrodo fijo, y así obtener una superficie de electrodo constante; y a la vez impedir la difusión de las soluciones al interior de la punta, y no medir potenciales combinados de C° -solución. Este electrodo se utilizará en las valoraciones volumétricas con reacciones de óxido-reducción.

c) Microelectrodo de plata (Ag°).

Es un electrodo semejante al anterior, donde el C° se ha sustituido por un alambre de Ag. Este electrodo se utilizará para las valoraciones volumétricas con reacciones de precipitación, y con reacciones de formación de complejos.

1.2 Potenciometría. Valoraciones volumétricas.

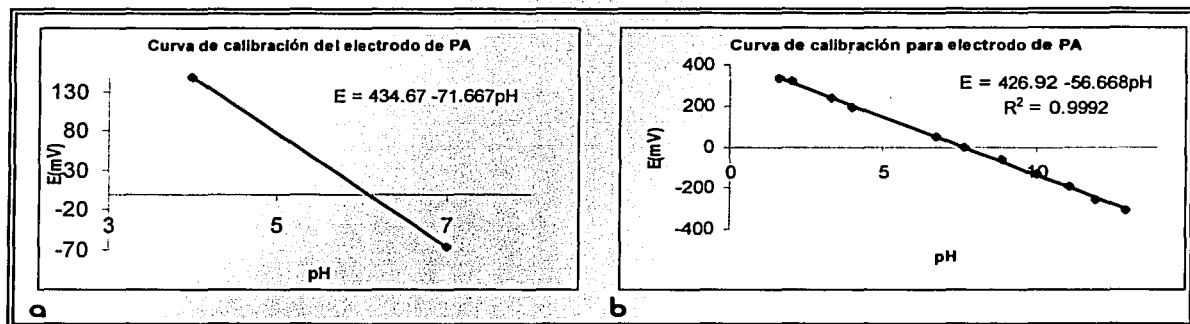
1.2.1. Calibración del electrodo de PA como electrodo de pH.

La calibración del electrodo de PA se realizó determinando la Ecuación de Nikolsky^[5,6,7,8] que describe el comportamiento de un electrodo selectivo a la actividad al ion H^+ , utilizando una solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4 comercial (Sigma) y una solución amortiguadora de bitalatos pH=4.01 (Sigma) utilizando el Eref de $Cu|Cu(II)|$ y midiendo la diferencia de potencial entre ambos electrodos con un multímetro digital comercial de bajo costo (Proam). Además, aparte de obtener una ecuación con una pendiente cercana a 60 mV con estas dos soluciones, tal como describe la ecuación de Nikolsky, se realizó la calibración con una mezcla de ácidos, determinando el pH de la mezcla con un electrodo de vidrio convencional y un potenciómetro (Sargent-Welch) calibrado con las soluciones antes mencionadas y midiendo la diferencia de potencial simultáneamente con el E_{PA} y el Eref. Se realizó la gráfica de $E=f(pH)$ para ambas calibraciones, se obtuvo la ecuación de Nikolsky en ambos casos y se determinó el coeficiente de correlación para ambas rectas.

Es importante mencionar que el segundo método de calibración se realizó para comprobar que el sistema de determinación de pH PA-Cu[Cu(II)] presenta el mismo comportamiento que tiene cuando es calibrado solo con dos valores de pH, además de que la curva de calibración obtenida presenta mayor información sobre el electrodo mismo. Se demuestra que el primer método es suficiente, como ocurre en la calibración del electrodo de vidrio y el potenciómetro convencional. En la gráfica 2 se muestran las curvas de calibración típicas por uno y otro método. La mezcla de ácidos utilizada estuvo compuesta por:

- a) Ácido Oxálico
- b) Ácido Cítrico
- c) H_3PO_4
- d) H_3BO_3
- e) Fenol

La mezcla de ácidos se preparó en una concentración de 0.1 F para cada uno de ellos.



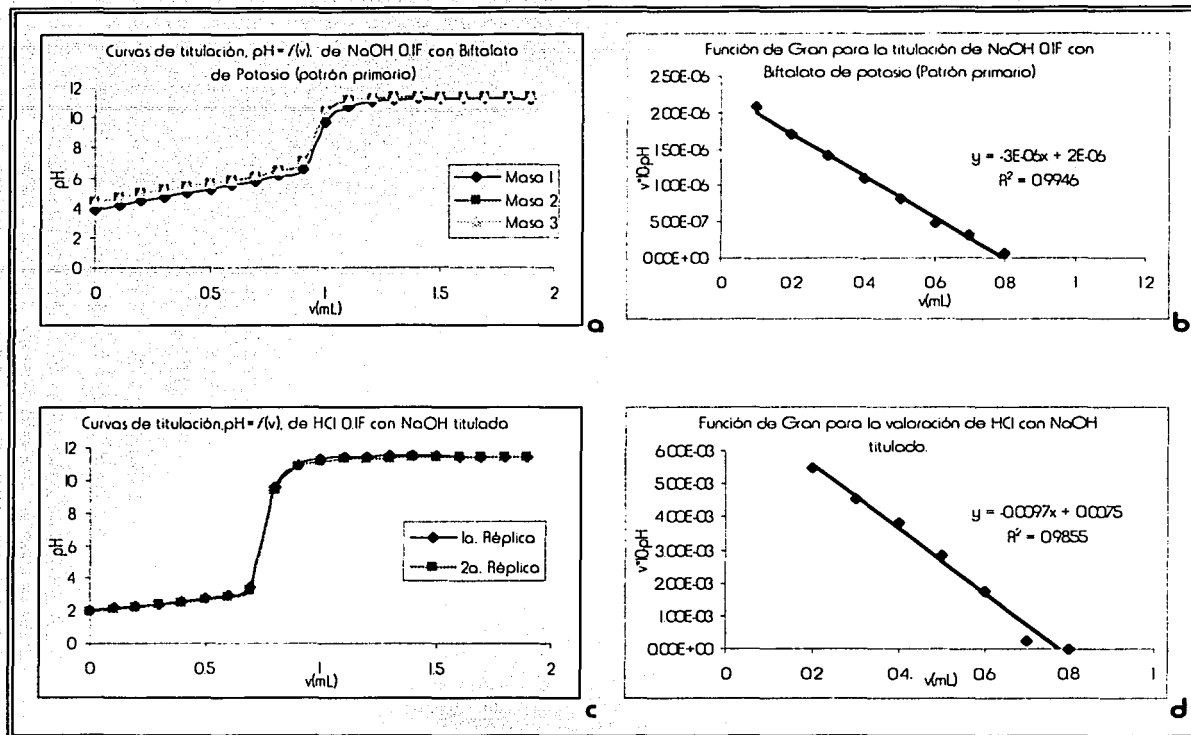
Gráfica 2. a: Curva de calibración y ecuación de Nikolsky para el electrodo de PA a dos valores de pH. **b:** Se muestra la misma curva de calibración y la ecuación de Nikolsky, pero a diferentes valores de pH (mezcla de ácidos). En ambos casos, se observa que la pendiente de la ecuación es cercana a 60 mV, con lo que se comprueba que la PA es sensible al pH.

1.2.2. Titulación de HCl con NaOH titulado.

1.2.2.1. Titulación de HCl por monitoreo micropotenciométrico del pH.

Se preparó una solución de NaOH de concentración 0.1F, la cuál se tituló o "normalizó" utilizando un patrón primario, en este caso Biftalato de potasio R.A. seco y con monitoreo micropotenciométrico, con el E_{PA} , del volumen de punto final (Vp.f.). La titulación se realizó por triplicado. La curva de titulación típica se muestra en la gráfica 3. El Vp.f. para cada una de las titulaciones se determinó utilizando la Función de Gran^[9,10] para los volúmenes antes del punto de equivalencia. En la gráfica 3 se observa también la gráfica típica correspondiente a la función de Gran.

Una vez obtenido la concentración exacta de NaOH con el experimento descrito anteriormente, se procedió a la titulación de una solución de HCl 0.1F con monitoreo micropotenciométrico del punto final, utilizando el NaOH como patrón secundario. Las curvas de titulación, $pH=f(v)$, para este caso de presentan en la gráfica 3. La determinación del Vp.f. para cada uno de los ensayos se realizó utilizando la primera derivada de la curva de titulación.



Gráfica 3. a. Curvas de titulación, $pH=f(v)$, típicas de la "normalización de NaOH con Biftalato de potasio. La diferencia de Vp.f. se debe a la variación en cada una de las masas de patrón primario utilizado. **b.** Gráfica de la función de Gran, $v \cdot 10^{pH} = f(v)$, donde se observa la interpolación del valor del Vp.f. para la normalización de NaOH, usando la masa 3 de patrón primario. **c.** Curvas de titulación, $pH=f(v)$, típicas de dos réplicas de "normalización" de HCl con NaOH patrón secundario. **d.** Gráfica de la función de Gran, $v \cdot 10^{pH} = f(v)$, donde se observa la interpolación del valor del Vp.f. para la valoración de HCl con NaOH titulado.

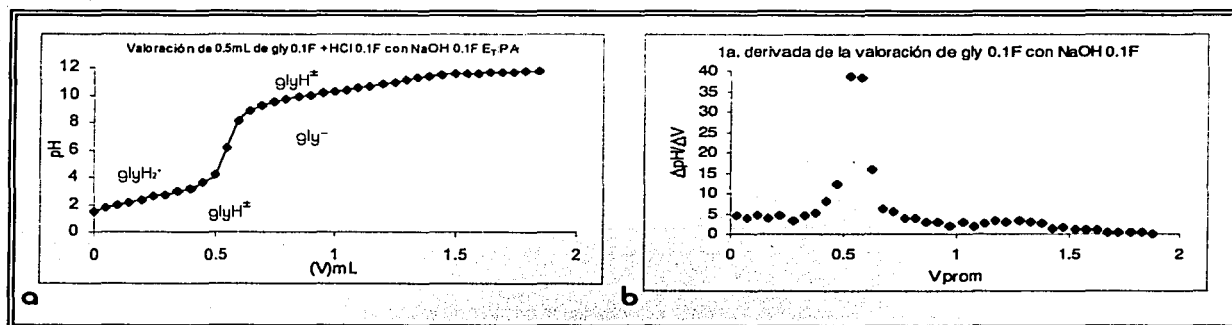
Los resultados de la titulación de NaOH con Biftalato de potasio, y de HCl con patrón secundario se muestran en la tabla I.

Tabla I. Resultados de la titulación y valoración volumétricas de NaOH y HCl respectivamente tanto con indicador visual como con monitoreo micropotenciométrico del pH.

Sistema de estudio	C _{nominal} (mol/L)	Sistema de monitoreo	Vp.f. (mL)		Titulo calculado (mol/L)
NaOH/Biftalato de potasio R.A.	0.1000	Indicador visual	1.2		0.0904
		Micropotenciométrico	1ª derivada	0.9697	0.1111
			Función de Gran	0.8000	0.1397
HCl/NaOH patrón secundario	0.1000	Indicador visual	0.85		0.0746
		Micropotenciométrico	1ª derivada	0.7576	0.0684
			Función de Gran	0.7833	0.0708

1.2.3. Titulación de glicina con NaOH. Determinación de pK_{a1} y pK_{a2} .

Se construyó un sistema de determinación de pH PA- $Cu|Cu(II)||$ para hacer una titulación de una alícuota de una solución del aminoácido Glicina (gly) 0.1F en medio ácido con NaOH 0.1F. La curva de titulación, $pH = f(V)$, se monitoreó micropotenciométricamente con el sistema antes mencionado. De la curva de titulación se determinó el pK_{a1} y el pK_{a2} del aminoácido gly. Se utilizó el método de la "primera derivada" de la misma curva para obtener el Vp.f. de la valoración. Para hacer comparativo el experimento, se determinaron los valores de pK_{a1} y pK_{a2} de gly simultáneamente con un electrodo combinado comercial y utilizando volúmenes de muestra convencionales. Con fines estadísticos, se realizaron 5 réplicas de cada una de las determinaciones, tanto para el electrodo combinado como para el electrodo de PA. En la gráfica 4 se muestra la curva de titulación típica de gly 0.1F en medio ácido con NaOH 0.1F en condiciones de microescalamiento, así como la gráfica correspondiente a la "primera derivada" de la misma. En la gráfica 5 se muestran los mismos resultados, pero para el electrodo combinado comercial. Finalmente, la tabla 1 contiene los resultados concluyentes de la determinación experimental del pK_{a1} y el pK_{a2} de la glicina con el electrodo de PA y el combinado, así como los valores de éstos reportados en la literatura.



Gráfica 4. a: Curva de valoración típica para 0.5 mL de gly 0.1F en medio ácido (0.5 mL de HCl 0.1F) con NaOH 0.1F. Se observa un Vp.f. alrededor de 0.5 mL agregados y, aunque menos cuantitativo, un segundo Vp.f. alrededor de 1 mL. En la gráfica se muestra el par conjugado de la gly a los cuales corresponde el pK_a determinado. **b:** Se muestra la gráfica típica correspondiente a la "primera derivada" de la curva de valoración, en la cual se pueden calcular los dos Vp.f.'s de la valoración. En este caso, al tener el Vp.f. se puede conocer el volumen correspondiente al 50% y al 150% valorado, y el pH para cada uno de los volúmenes está referido al pK_{a2} y pK_{a1} respectivamente.

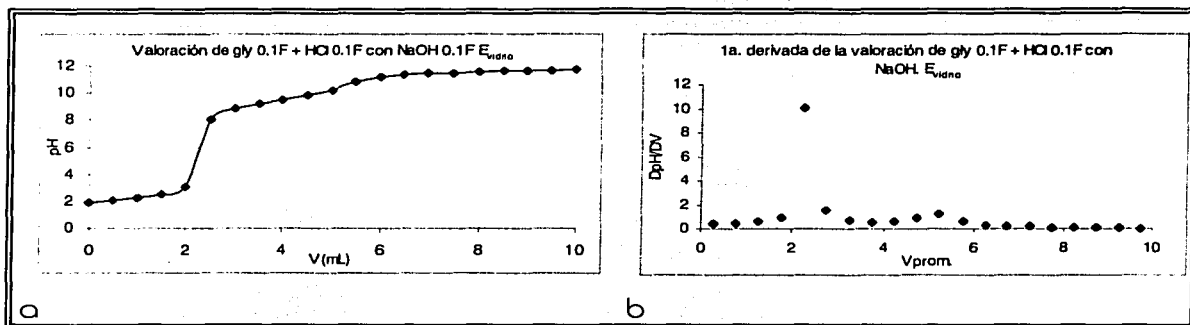


Gráfico 5. a: Curva de valoración típica para 2.5mL de gly 0.1F en medio ácido (2.5mL de HCl 0.1F) con NaOH 0.1F. Se observa un Vp.f. alrededor de 2.5mL agregados y, aunque menos cuantitativo, un segundo Vp.f. alrededor de 5.0mL. En la gráfica se muestra el par conjugado de la gly a los cuales corresponde el pKa determinado. **b:** Se muestra la gráfica típica correspondiente a la "primera derivada" de la curva de valoración, en la cual se pueden calcular los dos Vp.f.'s de la valoración. En este caso, al tener el Vp.f. se puede conocer el volumen correspondiente al 50% y al 150% valorado, y el pH para cada uno de los volúmenes está referido al pKa₂ y pKa₁ respectivamente

Para hacer una determinación de los pKa's de la gly, se hizo el gráfico de los valores de pKa₁ y pKa₂ que se encontraron en cada una de las cinco replicas, tanto con el electrodo de PA como con el electrodo de vidrio. Para cada uno de los casos se esperaba que la razón de cambio entre cada réplica fuese cercana a cero, o sea, el valor de la pendiente de la recta que describe el cambio del valor de pKa entre cada determinación, de este modo, la ordenada al origen representa el valor de pKa determinado con el electrodo en cuestión, ya sea con E_{PA} o electrodo combinado. En la gráfica 5 se muestran las gráficas con las que determinaron los respectivos valores de pKa para cada electrodo.

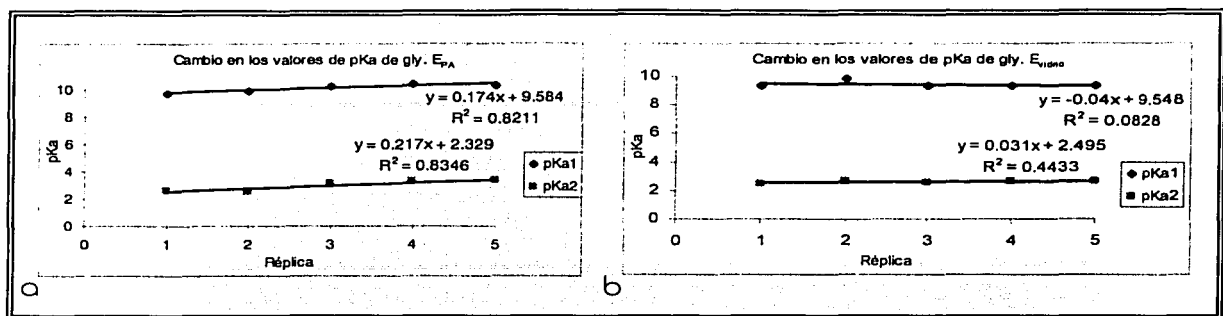


Gráfico 6 a: Cambio de ambos valores de pKa para las especies de gly en cada réplica determinadas con electrodo de PA. Nótese que la pendiente es cercana a cero, y el valor de pKa₁, correspondiente al valor de la ordenada al origen de la ecuación es 9.584; el valor de pKa₂ es igual a 2.329. **b.** Cambio de ambos valores de pKa para las especies de gly en cada réplica determinadas con electrodo combinado. Nótese que la pendiente es cercana a cero, y el valor de pKa₁, correspondiente al valor de la ordenada al origen de la ecuación es 9.584; el valor de pKa₂ es igual a 2.495.

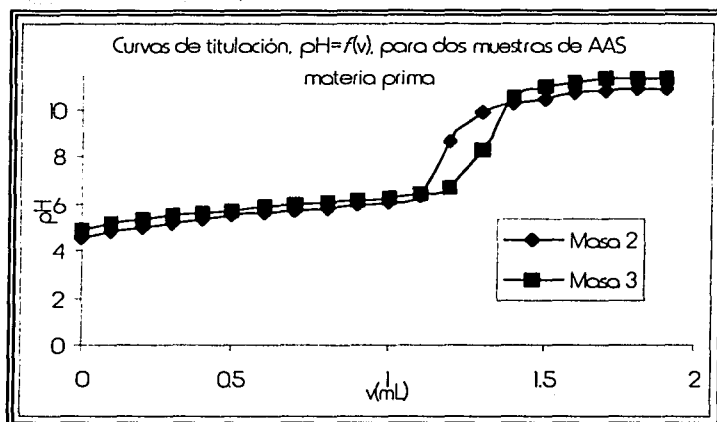
Tabla II. Valores de pKa₁ y pKa₂ determinados con el electrodo de PA comparados con los determinados con el electrodo combinado y con los reportados en la literatura.

	REPORTADO A 25°C [1]	E _{PA}	EVIDRIO
pKa ₁	9.6	9.584	9.584
pKa ₂	2.34	2.329	2.495

1.2.4. Control de la pureza de Ácido Acetilsalicílico, materia prima.

Desde el siglo antepasado, el Ácido Acetilsalicílico (AAS) ha sido el analgésico por excelencia alrededor del mundo. Su investigación exhaustiva ha llegado a descubrirle desde propiedades antiinflamatorias y analgésicas-antipiréticas hasta beneficios en patologías cardiacas. Es el compuesto estándar en la comparación y evaluación de otros fármacos. A pesar de la eficacia e inocuidad del AAS como analgésico y antirreumático, es importante saber que puede intervenir en el Síndrome (Sx) de Reye y constituir una causa común de intoxicación letal en población infantil, así como la posibilidad que tiene de ocasionar toxicidad grave si se le utiliza de manera inadecuada. Innumerables datos señalan que el consumo de salicilatos constituye un factor importante de daño hepático y encefalopatía intensa (que se observa en el Sx de Reye). No se ha corroborado una relación causal entre los salicilatos y el Sx mencionado, pero se advierte un notable vínculo epidemiológico. Por lo general los salicilatos actúan gracias a su contenido de ácido salicílico, aunque algunos de los efectos característicos del AAS se deben a su propiedad de acetilar proteínas. A dosis altas, los salicilatos ocasionan efectos tóxicos en el Sistema Nervioso Central, que incluye estimulación y después depresión. En ocasiones se observa confusión, vértigos, hipoacusia, delirio, psicosis estupor y coma. Por lo regular, los síntomas desaparecen a los dos o tres días de interrumpir el consumo del fármaco. El AAS ingerido se absorbe con rapidez, en parte en el estómago, pero en su mayor parte en la porción superior del intestino delgado. La rapidez de absorción depende de factores diversos, en particular, la velocidad de desintegración y disolución de las tabletas, el pH de las superficies mucosas y el vaciamiento gástrico. La presencia de alimento retrasa la absorción del AAS. Los salicilatos se distribuyen en todos los tejidos corporales y líquidos transcelulares, más bien por procesos pasivos que dependen del pH. Los salicilatos son biotransformados en muchos tejidos, aunque dicho fenómeno ocurre sobretodo en el retículo endoplásmico y mitocondrias de hepatocitos. Finamente son excretados en la orina en formas diversas. De todos los datos mencionados anteriormente, se advierte que la producción de medicamentos con éste fármaco siga siendo de las más importantes de controlar. En esta sección se propone el control de la pureza de AAS, materia prima, por un método de valoración micropotenciométrico, utilizando el sistema de monitoreo de pH con E_{Pa} como elemento sensor del nivel de acidez. Este método de valoración propuesto es una alternativa al método oficial de valoración en retroceso. ^[12]

Para este método, se pesó una masa conocida de AAS equivalente a 0.1 mol, la cual se disolvió en 1.0 mL de agua destilada y se agitó durante 5 minutos. Posteriormente se valoró la solución con NaOH previamente titulada con Biftalato de potasio seco y monitoreo visual. Durante la valoración de AAS se monitorearon micropotenciométricamente los valores de pH con el E_{PA} y como $E_{ref} Cu|Cu(II)|$. La valoración se realizó por triplicado, bajo las mismas condiciones. El Vp.f. se determinó utilizando el método de la "Primera derivada". En la gráfica 7 se muestran las curvas de valoración, $pH=f(v)$, de dos de las muestras ensayadas para evaluar la pureza de la materia prima.



Gráfica 7. Se muestran dos curvas de valoración, por titulación, $pH=f(v)$, simultáneamente. La variación en el Vp.f. para cada uno se debe a que la cantidad de muestra ensayada. El sistema de monitoreo de pH fue PA- $Cu|Cu(II)|$.

Finalmente, la pureza de AAS, materia prima, determinada por este método fue de **116.1%**. La FEUM, 6ª edición, establece los límites entre $99.0\% < 101.0\%$, por valoración volumétrica de tipo retroceso. Evidentemente, con fines docentes en Química Analítica básica, el dato encontrado es suficiente.

1.25. Valoraciones volumétricas en medio no acuoso. Determinación de la pureza de metronidazol, materia prima.

El metronidazol es un antiparasitario por excelencia, además es uno de los fármacos de elección para combatir infestaciones de *E. histolytica*, que es la parasitosis de mayor importancia en México^[3]. El uso de metronidazol tiene amplia cobertura a lo largo del país, y se puede encontrar principalmente en suspensiones y tabletas.

El descubrimiento de la azomicina en 1955 y la demostración de sus propiedades tricomonocidas fueron los puntos de partida de la síntesis química y el estudio biológico de muchos nitroimidazoles. Se observó que el compuesto llamado metronidazol poseía actividad particularmente grande tanto *in vitro* como *in vivo* contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*. El metronidazol posee un espectro amplio de actividad antiprotozoica y antimicrobiana que se utiliza con ventaja en seres humanos; es activo contra protozoarios anaerobios parásitos muy diversos y bacterias anaerobias. Tiene acción tricomonocida directa. La actividad amebicida del metronidazol contra *E. histolytica* es notable, ya sea que prolifere por sí sola o en cultivo mixto. El mecanismo de acción de este fármaco se refleja en la toxicidad selectiva que posee contra microorganismos anaerobios o microaerófilos, y por células anóxicas o hipóxicas. Podría considerarse al metronidazol como un profármaco porque necesita activación metabólica por parte de microorganismos sensibles. Una vez que se ha difundido al interior de ellos y de las células, el grupo nitro acepta electrones de proteínas transportadoras de electrones con potenciales redox negativos suficientemente pequeños, como las flavoproteínas en células de mamíferos y las ferredoxinas o su equivalente en protozoos y bacterias. La actividad antimicrobiana del metronidazol es quizá consecuencia de la formación de productos intermediarios hábiles químicamente reactivos que se forman durante la reducción tetraelectrónica del grupo nitro hasta la formación de la hidroxilamina correspondiente. Una vez que se ha ingerido el compuesto, por lo común se absorbe de manera completa y rápida. La vida media del metronidazol en plasma es de 8 horas aproximadamente, y su volumen de distribución es aproximadamente el agua corporal total. En promedio, aproximadamente el 10% del compuesto está ligado a proteínas plasmáticas. El metronidazol penetra adecuadamente en líquidos y tejidos corporales que incluyen secreciones vaginales, líquido seminal, saliva y leche materna. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) se alcanzan también cifras terapéuticas. El metronidazol original y algunos de sus metabolitos son excretados en diversas proporciones en la orina después de que el individuo ingiere el compuesto primario. El hígado es el órgano principal en que se metaboliza, y tal fenómeno explica más del 50% de la desaparición del metronidazol a nivel sistémico. El metronidazol es un amebicida eficaz, y se ha vuelto el fármaco más indicado para tratar todas las formas sintomáticas de amebiasis. Se recomienda en todas las áreas geográficas y sin importar la virulencia del parásito y la forma de infección por combatir. No se ha confirmado la aparición de resistencia de *E. histolytica* al metronidazol a pesar del uso amplio de este compuesto en seres humanos. Además del uso de metronidazol en amebiasis, también se le emplea en el tratamiento de infecciones de vías genitales causadas por *T. vaginalis* en mujeres y varones, así como en infecciones por *G. lamblia*, aunque su empleo contra dicho microorganismo aun se considera de tipo experimental.

Además, es extraordinariamente útil en la terapéutica de infecciones por bacterias anaerobias sensibles como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Helicobacter*, en las cuales el fármaco se administra por vía intravenosa.

El metronidazol a dosis altas y por largo tiempo es carcinógeno; en roedores y bacterias también es mutágeno. Sin embargo, no hay datos de que las dosis terapéuticas del fármaco conlleven un riesgo notable y mayor de cáncer en seres humanos. Los datos con respecto a los efectos teratogénicos del metronidazol son antagónicos, sin embargo no se recomienda su uso durante el primer trimestre del embarazo. De todos los datos expuestos anteriormente se observa la importancia del control de la pureza del metronidazol como materia prima para las formas farmacéuticas en las que se presenta este fármaco. Sin embargo, su análisis oficial¹⁴⁾ requiere de una valoración en ácido acético glacial (AcOH) ya sea utilizando Cristal Violeta (CV) como indicador visual del Vp.f. o con monitoreo potenciométrico del mismo, con electrodo de vidrio. Es bien sabido que la membrana del electrodo de vidrio es lábil a disolventes diferentes de agua, y que su uso en estos disolventes va degradando la misma, al punto de ser inservibles; por lo que la vida efectiva del electrodo de vidrio se ve acortada cuando se usa en disolventes no acuosos.

En este trabajo se propone el uso de el electrodo de POSAI como electrodo sensible de pH, en sustitución del electrodo de vidrio convencional, y además, con la miniaturización del análisis, la reducción de desechos y residuos generados por la gran cantidad de soluciones de AcOH utilizadas en este análisis, el cual es de rutina en numerosos laboratorios de control de calidad.

Para el sistema de monitoreo de pH se ensayaron dos electrodos de referencia a base de plata. No se utiliza cobre debido a que el AcOH degrada este metal con relativa facilidad, con la consecuente formación de $\text{Cu}[(\text{COO})_2]_2$. Los electrodos de referencia se esquematizan en la figura 4, así como el electrodo de POSAI.

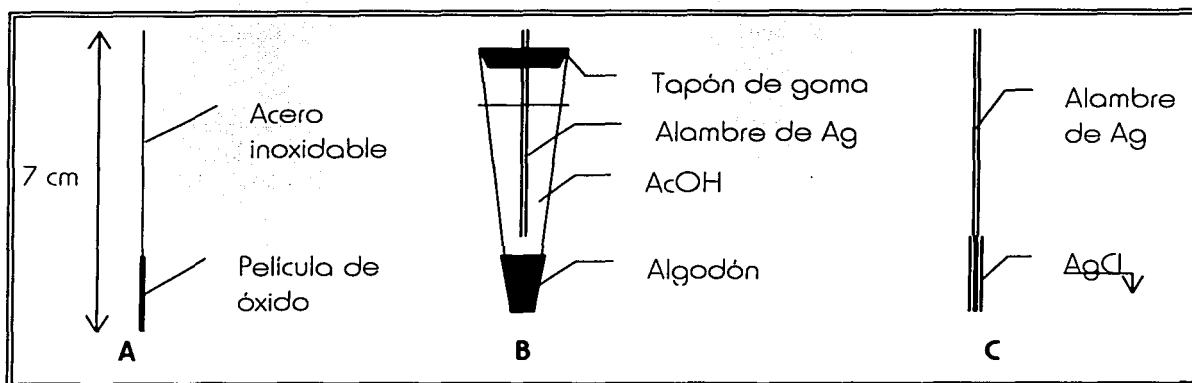


Figura 4. A: Electrodo de POSAL. B: Eref de $\text{Ag}^0|\text{AcOH}||$. C: Eref de $\text{Ag}|\text{AgCl}$

Como se mencionó anteriormente, el análisis oficial de la pureza del metronidazol se realiza en AcOH. El metronidazol, en AcOH, se comporta como una base susceptible de reaccionar con un ácido en el mismo disolvente. Esta reacción es de cinética rápida, cuantitativa y de estequiometría conocida (1:1), por lo que se utiliza como reacción de valoración en la determinación de la pureza del este principio activo en materia prima. La determinación del Vp.f. de esta reacción de valoración se puede monitorear por dos métodos: potenciométrico y con indicador visual CV. A continuación se muestran los resultados obtenidos cuando una masa conocida aproximadamente de 0.1 mmol de metronidazol y disuelta en AcOH se valora con HClO_4 0.1 F. Para conocer la pureza de la muestra, se tuvo que normalizar previamente la solución de HClO_4 0.1 F con un patrón primario adecuado. La normalización del titulante se realizó tanto potenciométricamente como con indicador visual CV como monitoreo del Vp.f. Para la determinación de la pureza del analito en cuestión, se utilizó la concentración exacta de la solución de HClO_4 obtenida con el monitoreo con indicador visual.

1.2.5.1. Calibración del electrodo de POSAI.

La calibración del electrodo de POSAI para la determinación de pH se realiza de modo similar que la calibración del electrodo de PA. Es importante destacar que las soluciones reguladoras de pH utilizadas para la calibración son, evidentemente, en AcOH. De la literatura ^[15] se conoce el valor de pKa del HClO₄ en este disolvente, el cual es de 4.87. Además de que se sabe que en éste disolvente, el HClO₄ es un ácido nivelado, pero no fuerte, ya que no forma cuantitativamente iones H⁺, por lo que a partir de una solución de HClO₄ de concentración conocida se puede calcular su pH en AcOH. Ejemplo:

Se sabe que para un ácido no nivelado:
$$pH = \frac{1}{2}(pKa + pCo) \quad [16]$$

Si se cuenta con una solución de HClO₄ de concentración nominal 0.1 F, normalizada convenientemente, y con el valor de pKa en AcOH y sustituyendo los datos en la ecuación anterior, se puede calcular el pH de la solución. Si la concentración exacta de la solución de HClO₄ es de 0.0798=Co, entonces:

Calculando el pCo:

$$pCo = -\log Co = -\log(0.0798) = 1.097997109$$

Sustituyendo en la ecuación de pH:

$$pH = \frac{1}{2}(pKa + pCo) = \frac{1}{2}(4.87 + 1.097997109) = 2.983998554$$

Redondeando:

$$pH = 2.98$$

Nótese que solo se cuenta con una solución de pH conocido. Si se hace una dilución de la solución anterior, se tendrá, evidentemente, una solución diluida, la cual tendrá un valor de pH diferente. Suponiendo que la solución se diluyó en un orden de 10 veces, la concentración de la nueva solución de HClO₄ es de 0.00798= Co. Para calcular el pH de la nueva solución, se sustituyen los valores de pKa y de pCo.

Calculando pCo : $pCo = -\log Co = -\log(0.00798) = 2.097997109$

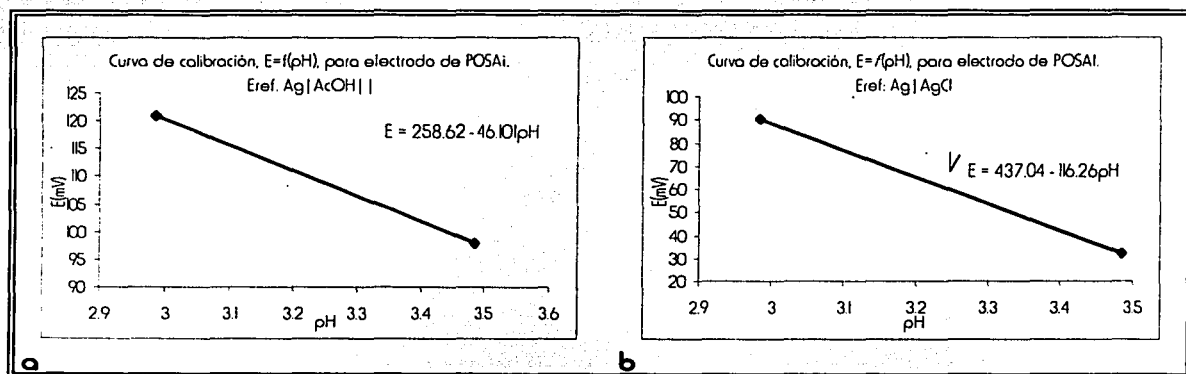
Sustituyendo en la ecuación de pH :

$$pH = \frac{1}{2}(pKa + pCo) = \frac{1}{2}(4.87 + 2.097997109) = 3.483998554$$

Redondeando:

$$pH = 3.48$$

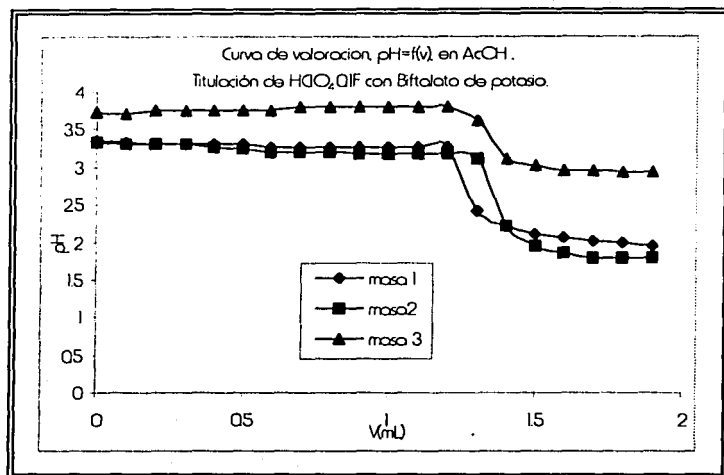
Ahora, ya se cuentan con soluciones de pH conocido en $AcOH$. Si se mide el potencial de estas soluciones, con un electrodo de referencia conveniente, y se grafica $E=f(pH)$, se puede conocer la ecuación de Nikolsky que relaciona el potencial de una solución con su valor de pH . En la gráfica 8 se muestran las curvas de calibración del electrodo de POSAI con dos E_{ref} diferentes, y se puede observar que la curva de calibración que describe un mejor comportamiento al pH , según la ecuación de Nikolsky, en aquella donde el E_{ref} utilizado es a base de $Ag^0|AcOH||$.



Gráfica 8. Curvas de calibración para el mismo electrodo de POSAI, pero con dos E_{ref} diferentes. **8a:** $E_{ref}: Ag^0|AcOH||$. **8b:** $E_{ref}: Ag|AgCl$. Nótese que el sistema que tiene una ecuación de Nikolsky, con una pendiente cercana a ~ 60 mV es aquel donde el E_{ref} es de $Ag^0|AcOH||$.

1.2.5.2 Titulación de HClO_4 0.1 F en AcOH .

Las soluciones de HClO_4 en AcOH se pueden normalizar utilizando Biftalato de potasio como patrón primario. La estequiometría de la reacción es 1:1. Como ya se mencionó, la normalización del HClO_4 se realizó tanto con monitoreo del Vp.f. potenciométrico como con CV. En la gráfica 9 se presentan las curvas de valoración potenciométricas con electrodo de POSAI como electrodo sensible al pH en AcOH .



Gráfica 9. Se muestran las curvas de valoración, $\text{pH}=f(v)$, para la normalización de la solución de HClO_4 0.1 F con monitoreo potenciométrico. El electrodo de pH es de POSAI. Los Vp.f. para cada uno de los ensayos se calcularon con la primera derivada de las curvas de valoración.

En la tabla III se muestran los resultados obtenidos de la normalización de HClO_4 0.1 F con Biftalato de potasio como patrón primario para tres ensayos.

Tabla III. Concentración exacta de la solución de HClO_4 de concentración nominal 0.1 F calculada con los dos sistemas de monitoreo de Vp.f.

Sistema de monitoreo	Concentración exacta (M)
Indicador visual (CV)	0.0794
Micropotenciométrico	0.0765

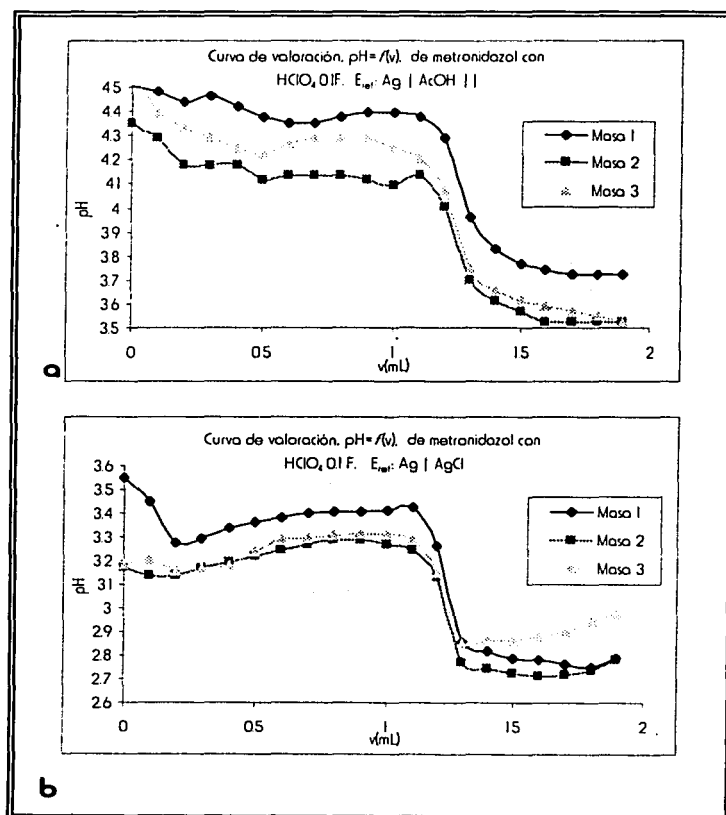
1.2.5.3. Determinación de la pureza de Metronidazol, materia prima.

Como ya se mencionó en repetidas ocasiones, el metronidazol se puede valorar con métodos volumétricos en AcOH con monitoreo de Vp.f. tanto visual como potenciométrico. De la muestra de materia prima, se pesó una cantidad conocida de analito, y se disolvió en AcOH. Una vez disuelta la muestra, se procedió a la valoración de la misma con una solución de HClO_4 previamente normalizada con un monitoreo de Vp.f. con CV. Para el caso de la muestra, el monitoreo con indicador visual fue realizado con CV, que al punto de equivalencia, vira de color violeta a azul. Cada ensayo se realizó por triplicado, y los resultados obtenidos por ésta variante son expuestos en la tabla IV. Por otro lado, la valoración potenciométrica se realizó con el electrodo de POSAI como el electrodo de trabajo, y ambos Eref de plata. En la gráfica 10 se muestran las curvas de valoración para cada uno de los Eref utilizados.

Gráfica 10. Curvas de valoración, $\text{pH} = f(v)$, de las muestras de metronidazol.

a: Se muestra la curva de valoración para tres masas de muestras diferentes, utilizando el electrodo de POSAI como elemento sensor de pH, y como electrodo de referencia $\text{Ag}^\circ | \text{AcOH} ||$. **b:** Se muestra la curva de valoración para tres masas de muestras diferentes, utilizando el electrodo de POSAI como elemento sensor de pH, y como electrodo de referencia $\text{Ag}^\circ | \text{AgCl} ||$.

En ambos casos, la diferencia en los Vp.f. es debida a la cantidad de muestra utilizada.



De las curvas de titulación presentadas en la gráfica 10, se calculó el $V_{p.f.}$ para cada una de las masas de muestra ensayado por el método de la primera derivada. En la tabla IV se muestran los resultados de la determinación de la pureza de metronidazol, materia prima, con las variantes ensayadas.

Tabla IV. Resultados de pureza de metronidazol, materia prima, con los diferentes variantes ensayados. Evidentemente, se toma como referencia el dato encontrado con el sistema de monitoreo con indicador visual.

Sistema de monitoreo	Pureza (%)
Indicador visual (CV)	97.6
POSAI / $Ag^{\circ} AcOH $	94.8
POSAI / $Ag^{\circ} \underset{\downarrow}{AgCl}$	95.4

1.2.6. Valoraciones volumétricas con reacciones de óxido-reducción. Determinación del contenido de $FeSO_4$ en tabletas.

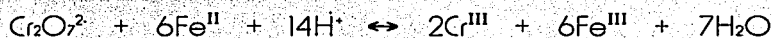
1.2.6.1. Definición del parámetro adimensional pe .

Así como en las reacciones ácido-base se utiliza el parámetro denominado pH , con el fin de adimensionar las respuestas medidas de los sistemas de estudio, y además tener una respuesta lineal, en la potenciometría a corriente nula, donde se ven involucradas reacciones de óxido-reducción, formación de complejos y de precipitación, se utilizará el parámetro adimensional pe , el cual tiene la misma finalidad, ya que en todos estos casos, se miden diferencias de potencial de las soluciones durante el transcurso de la valoración. El parámetro adimensional pe , se obtiene dividiendo los datos de potencial medido directamente del sistema en estudio por 0.059 V. Como en todos los casos aquí presentados, las medidas de potencial fueron del orden de 10^3 V, los datos obtenidos fueron divididos por 60 mV, o sea:

$$pe = \frac{E(mV)}{60mV}$$

1.2.6.2. Titulación de $K_2Cr_2O_7$ (Patrón secundario) con Sal de Mohr (Patrón primario)

Se sabe que el ión dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) es un oxidante fuerte, capaz de oxidar al ión ferroso ($Fe(II)$) el cual se encuentra en el compuesto $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, llamado comúnmente sal de Mohr. La reacción que ocurre se puede monitorear, ya sea con indicador visual redox, como la Difenilamina (DPA), que estado reducido es incoloro, y en estado oxidado es de color violeta; el otro modo de monitoreo de la reacción es potenciométrico, con un par de electrodos adecuados. En este trabajo se ensayaron los dos métodos de monitoreo de punto final de la reacción, ambos en condiciones de microescalamiento. Se preparó una solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.1 N, la cual fue titulada con 1 mmol de sal de Mohr patrón primario. Para la titulación indicador visual DPA, el patrón primario fue disuelto en 1 mL de una mezcla de H_2SO_4 : H_3PO_4 en proporciones 1:1. Ambos ácidos son concentrados. La reacción de titulación es:



Cuando hay exceso de $Cr_2O_7^{2-}$ en la solución, la DPA presenta un color violeta, lo que indica el punto final de la valoración. La concentración de $K_2Cr_2O_7$ encontrada con este método fue de 0.0998 N.

Para la titulación de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.1F con sal de Mohr, con monitoreo micropotenciométrico, el patrón primario de sal de Mohr fue disuelto en 1 mL de H_2SO_4 0.5F. Los electrodos utilizados fueron: E_i: C° , E_{ref}: $Cu|Cu(II)|$. En la gráfica II se muestra las curvas de titulación, $p_e=f(v)$, para la normalización de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.1F con sal de Mohr. Los Vp.f. fueron determinados con la primera derivada de cada una de las curvas de titulación mostradas en la misma gráfica. La concentración de $K_2Cr_2O_7$ encontrada con este método fue de 0.0889 N.

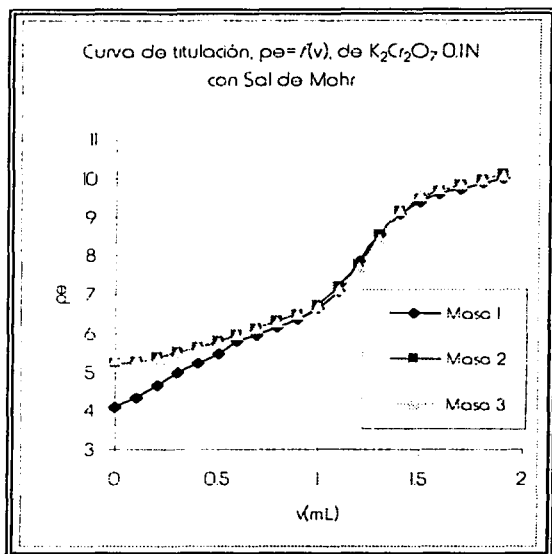


Gráfico II. Curvas de titulación, $pe=f(v)$, para la normalización de $K_2Cr_2O_7$ 0.1 N con Sal de Mohr como patrón primario. Nótese que se ha graficado el parámetro adimensional pe en lugar de E . En los tres casos se ha titulado una masa diferente de Sal de Mohr, aproximada a 1 mEq. Los electrodos utilizados fueron: $Et: C^{\circ} \quad E_{ref}: Cu^{\circ} | Cu(II) ||$. El medio de reacción en que se disolvió el patrón primario fue H_2SO_4 0.5 F

Para conocer el Vp.f. de cada una de las curvas de titulación, se recurrió nuevamente a la técnica de la "Primera derivada". En la tabla V se muestran los resultados de la normalización de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.1F con el patrón primario Sal de Mohr.

Tabla V. Resultados de la normalización de $K_2Cr_2O_7$ 0.1F con dos sistemas de monitoreo de Vp.f. de la titulación.

Sistema de monitoreo	Concentración exacta (M)
Indicador visual (DPA)	0.0998
Micropotenciométrico	0.0889

1.2.6.3. Determinación del contenido de FeSO_4 en tabletas, producto terminado.

El FeSO_4 se administra en tabletas como un suplemento de la deficiencia de hierro en anemia ferropénica, por lo que es considerado como un hematopoyético ¹⁷⁾ y que en países como México, con altas deficiencias nutricionales, es un medicamento ampliamente utilizado. Además, se prescriben tabletas de FeSO_4 a los donadores de sangre, ya sean familiares o altruistas. En este trabajo se propone la valoración del contenido de FeSO_4 en tabletas por medio de una volumetría con reacciones redox, y un sistema de monitoreo de Vp.f. de la valoración micropotenciométrico. Los electrodos a utilizar, tanto de trabajo como de referencia son los mismos utilizados en la titulación de la solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.1F con Sal de Mohr.

El análisis se realizó determinando el peso promedio de 5 tabletas de FeSO_4 , de contenido nominal de 200 mg por tableta, (equivalente a 60.27 mg de Fe elemental). Las tabletas se molieron en un mortero y se homogenizó la muestra. Se tomaron muestras de análisis del homogenizado, equivalentes a 0.1 mmol de FeSO_4 . A estas muestras de análisis se les añadió 1 mL de una mezcla de H_2SO_4 : H_3PO_4 : H_2O en proporciones 25:25:50.

Una vez colocado el medio de reacción, se comienza la valoración, sumergiendo los electrodos y haciendo adiciones de solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.1F previamente normalizada, tal como se explicó en el apartado anterior de éste trabajo. Para calcular el contenido de FeSO_4 en la muestra, y su vez en las tabletas, la concentración exacta de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ utilizada fue la que se determinó con DPA. En la gráfica 12 se muestran las curvas de valoración, $pe=f(v)$, para dos muestras analizadas, y cuyo comportamiento redox se ha monitoreado con los electrodos mencionados a lo largo de la valoración. Para conocer el Vp.f. de cada una de las valoraciones realizadas, se sometieron a un estudio de "Primera derivada", y posteriormente se calculó el contenido de FeSO_4 de las tabletas analizadas. Finalmente, las tabletas analizadas contienen **96.6%** de FeSO_4 respecto a la cantidad nominal referida en el marbete.

NOTA: La agitación de las soluciones durante las operaciones de titulación y valoración se debe de hacer de manera vigorosa, ya que los medios de reacción son muy densos.

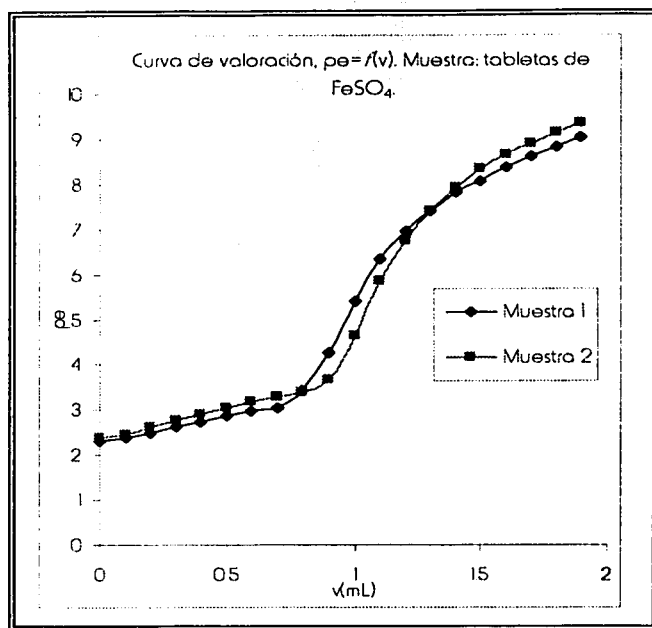


Gráfico 12. Curvas de valoración, $pe=f(v)$ para la muestra de tabletas de $FeSO_4$. El medio de reacción en los dos casos es 1 mL de $H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O$ en proporciones 25:25:50.

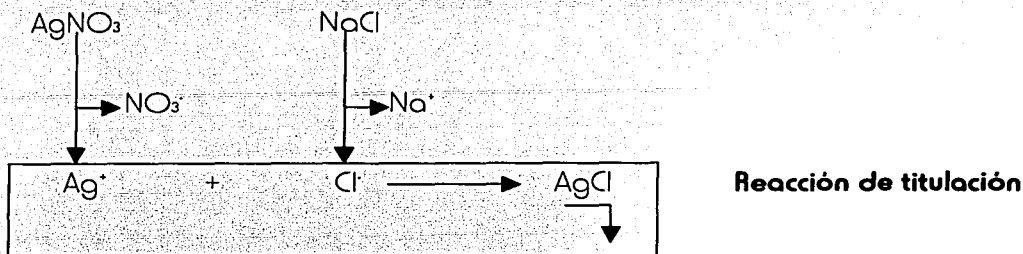
El reactivo titulante fue $K_2Cr_2O_7$ 0.1N. La diferencia entre cada una de las curvas de valoración se debe a que las masas son diferentes. Los electrodos utilizados son los mismos que los utilizados para la normalización de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.1N.

1.2.7. Valoraciones volumétricas con reacciones de precipitación. Determinación de $NaCl$ en Solución Salina Isotónica.

1.2.7.1. Titulación de $AgNO_3$ (Patrón secundario) con $NaCl$ (Patrón primario)

Desde hace mucho tiempo, se sabe que cuando el ión Ag^+ y el ión Cl^- se encuentran, reaccionan de manera espontánea, produciendo $AgCl$, el cual precipita en solución acuosa. Conociendo esta información, la reacción entre estos dos iones ha sido ampliamente utilizada en la determinación de cloruros en diferentes muestras. Originalmente, este método fue desarrollado en 1832 por Gay-Lussac con el propósito de cuantificar plata de manera rápida y exacta. Posteriormente, Mohr modificó este método añadiendo el uso de indicador colorido, el K_2CrO_4 . Actualmente este método es conocido como el método de Mohr o método argentométrico.^[18]

En esta sección se presenta ésta técnica, pero con una metodología miniaturizada. Se preparó una solución de AgNO_3 0.1F, la cual puede ser titulada, con NaCl R.A. como patrón primario. La reacción de titulación que se lleva a cabo es la siguiente:



El Vp.f. de la reacción de titulación anterior se puede monitorear de dos modos: con indicador visual (K_2CrO_4 o Fluoresceína) o Potenciométrico. En este trabajo, se realizaron los dos métodos (con los dos indicadores visuales) para la titulación de la solución de AgNO_3 0.1F. Para ambos casos, se preparó una solución de NaCl R.A. de concentración conocida (5.84 mg NaCl/mL), la cual sirvió como patrón primario.

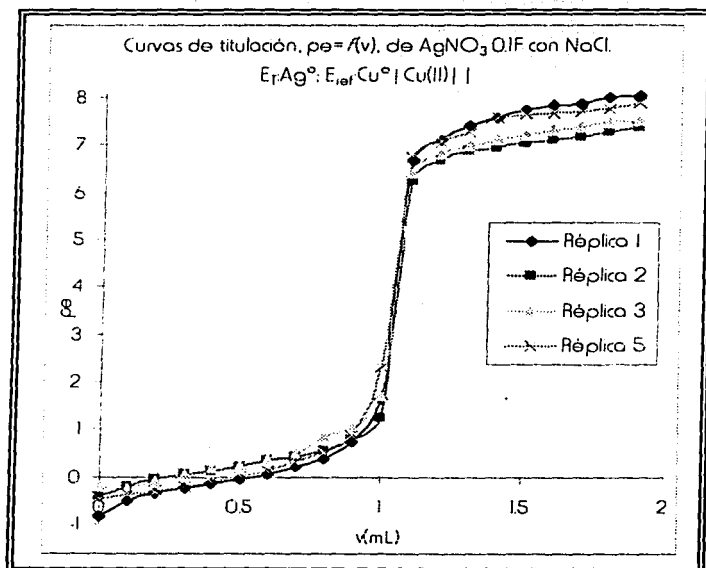
Como indicador visual de K_2CrO_4 , se utilizó una gota de una solución de concentración 15 mg/mL, en cada uno de los ensayos realizados. En el punto de equivalencia, este indicador cambia de color amarillo a anaranjado. Para el caso de la Fluoresceína, se utilizaron alícuotas de este indicador en forma sólida, el cual, en el punto de equivalencia, cambia de amarillo fluorescente a un tono *salmon* (rosado). Es importante mencionar que, cuando se usa Fluoresceína como indicador visual, la agitación debe de ser constante y pareja a lo largo de la titulación, así como en todas las réplicas de misma. Ya que variaciones a este respecto, causan un vire del indicador poco definido, haciendo que las réplicas no sean susceptibles de comparación. Los resultados obtenidos para el monitoreo con indicador visual se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Resultados de la titulación de AgNO_3 0.1F con dos indicadores visuales.

Indicador visual	Concentración exacta (M)
K_2CrO_4	0.0970
Fluoresceína	0.0952

Se utilizaron los dos indicadores, debido a que la Fluoresceína es el *indicador oficial* para la titulación de AgNO_3 , y el K_2CrO_4 , es el método original de Mohr. En la tabla VI se observa que hay una diferencia de 0.0018 unidades de concentración.

Para la titulación con monitoreo micropotenciométrico se utilizaron los siguientes microelectrodos: $\text{E}_r: \text{Ag}^\circ$, cuya fabricación se describió en el apartado 1.1.5. inciso c); como $\text{E}_{\text{ref}}: \text{Cu}|\text{Cu(II)}||$ En la gráfica 13 se muestran las curvas de titulación de AgNO_3 0.1F con NaCl , monitoreado con los microelectrodos mencionados.



Gráfica 13. Curvas de titulación, $pe=f(v)$, para la titulación de AgNO_3 con NaCl 5.84 mg/mL. Los microelectrodos utilizados son: $\text{E}_r: \text{Ag}^\circ; \text{E}_{\text{ref}}: \text{Cu}^\circ | \text{Cu(II)} | |$. Nótese la reproducibilidad de las réplicas. Los $V_{p.f.}$ de cada una de las gráficas se calcularon por el método de la "Primera derivada".

Los resultados de la titulación de la solución de AgNO_3 0.1F con monitoreo micropotenciométrico, al igual que con indicador visual, se resumen en la tabla VII, así como un el resultado de un estudio preliminar de recobro.

Tabla VII. Titulación de la solución de AgNO_3 0.1F con NaCl 5.84 mg/mL. Se presentan las diferentes variantes ensayadas. Además se muestra un estudio preliminar de recobro.

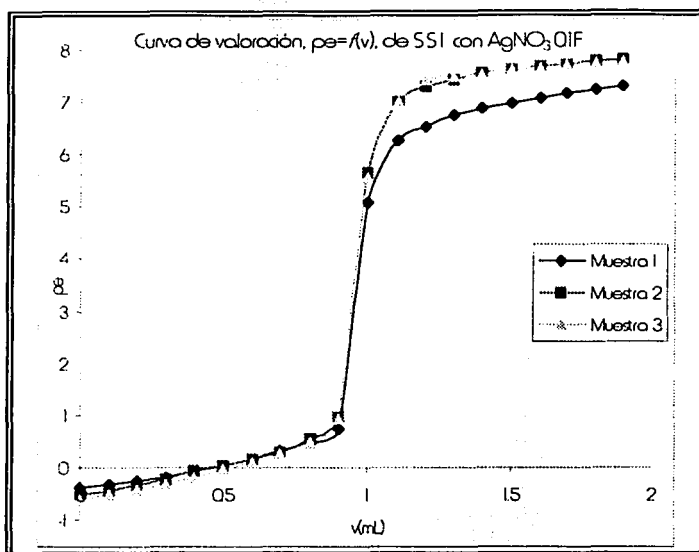
Sistema de monitoreo	Concentración exacta (M)	% de recobro
Indicador visual: K_2CrO_4	0.0970	100
Indicador visual: Fluoresceína	0.0952	97.1
Micropotenciométrico	0.0955	95.6

1.2.7.2. Determinación de NaCl en Solución Salina Isotónica.

La S.S.I. es una solución de NaCl estéril, la cual está a una concentración de 0.9% (p/v), equivalente a 0.1540 M. El uso de solución salina isotónica (S.S.I.) es muy diverso e importante en el área clínica. Ésta solución es administrada por vía intravenosa a pacientes que cursan con algún cuadro de deshidratación o en algunos casos de hipovolemia. Aunque existe la S.S.I. balanceada, la cual contiene glucosa, la S.S.I. es la más utilizada en el campo hospitalario. Además, en el laboratorio clínico se utiliza la S.S.I. como medio para dilución de sangre total o como medio para preparar soluciones las cuales estarán en contacto con células presentes en sangre periférica, entre otros usos. Con lo antes señalado, resulta evidente la importancia de controlar la concentración de NaCl en la S.S.I., la cual directamente relacionada con la isotonicidad del medio. En éste trabajo se presenta un método de control de dicha concentración mediante una valoración volumétrica con reacción de precipitación. Nótese que la reacción de valoración es la misma que la reacción de titulación de solución de AgNO_3 0.1F.

Como titulante se usó solución de AgNO_3 0.1F previamente titulada con NaCl patrón primario. La valoración de la muestra se monitoreó tanto potenciométricamente como con indicador visual Fluoresceína. En el monitoreo micropotenciométrico los microelectrodos utilizados son: $\text{E}_r: \text{Ag}^\circ; \text{E}_{ref}: \text{Cu}|\text{Cu}(\text{II})||$. Se realizaron tres réplicas de cada uno de las determinaciones mencionadas. En la gráfica 14 se muestran las curvas de valoración de una alícuota de 620 μL de S.S.I. comercial

Gráfica 14. Curvas de valoración, $p_e=f(v)$, para la valoración de NaCl en S.S.I. Los Vp.f. de cada una de las valoraciones se determinaron usando el método de la "Primera derivada". Et: Ag°
Eref: $Cu^{\circ}|Cu(II)|$



Los resultados de la valoración de NaCl en S.S.I., por reacción de precipitación, tanto con monitoreo visual como micropotenciométrico se presentan en la tabla VIII.

Tabla VIII. Valoración de NaCl en S.S.I. con dos sistemas de monitoreo. La concentración exacta de patrón secundario $AgNO_3$ 0.1F fue la determinada con indicador visual fluoresceína.

Sistema de monitoreo	Concentración (g NaCl / 100 mL)
Nominal	0.9000
Indicador visual	0.8884
Micropotenciométrico	0.9391

Como conclusión del análisis de S.S.I., en la tabla IX se muestran los resultados obtenidos según la concentración exacta de patrón secundario $AgNO_3$ 0.1F calculada por diferentes métodos.

Tabla IX Cálculo de las cantidades de NaCl en S.S.I. utilizando las diferentes concentraciones exactas calculadas de AgNO₃ 0.1F.

Sistema de monitoreo de la S.S.I.	Normalidad de patrón secundario AgNO ₃ 0.1F	g NaCl / 100 mL	% respecto al marbete
Indicador visual: Fluoresceína	K ₂ CrO ₄	0.9052	100.6
	Fluoresceína	0.8884	98.7
	Potenciometría	0.8912	99.0
Potenciometría	K ₂ CrO ₄	0.9568	106.3
	Fluoresceína	0.9391	104.3
	Potenciometría	0.9420	104.7

De la tabla anterior se puede observar que los métodos presentan diferente exactitud.

NOTA: Es preciso establecer que al usar Fluoresceína como indicador visual en la reacción utilizada se debe mantener una agitación fuerte y constante durante la misma.

1.2.8. Valoraciones volumétricas con reacciones de formación de complejos. Determinación de la dureza total de agua potable.

El control de la dureza del agua es de suma importancia tanto a nivel hospitalario, farmacéutico y en la salud pública. Este parámetro es una medida de la cantidad total de sales de Ca(II), en forma de CaCO₃ que se encuentra en solución en el agua potable. La dureza del agua se encuentra regulada por una o varias normas según sea el uso al cual esté destinado el líquido. La determinación de la dureza del agua se basa en la reacción de formación del complejo de Ca(II) con el quelante Ácido etilendiaminotetracético (EDTA), representado generalmente como Y⁴⁻ en medio básico (pH=10), y la reacción puede ser monitoreada ya sea potenciométricamente o con indicador visual Eriocromo negro T (NET) mezclado con NaCl. La normalización de la solución de Na₂H₂Y se realiza con Zn(II) si se utiliza un monitoreo con indicador visual; si el monitoreo es potenciométrico se realiza con CaCO₃ y con Ag⁺ a nivel trazas como reactivo piloto. En esta sección se realizaron los siguientes experimentos de las variantes antes mencionadas:

- a) Titulación de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 0.01\text{F}$ con Zn(II) monitoreo con indicador visual NET-NaCl
- b) Titulación de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 0.01\text{F}$ con CaCO_3 monitoreo micropotenciométrico
- c) Determinación de la dureza total de agua mediante valoración de una muestra con $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 0.01\text{F}$ titulado y monitoreo con indicador visual NET-NaCl.

1.2.8.1. Titulación de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 0.01\text{F}$ (Patrón secundario) con Zn(II) (Patrón primario).

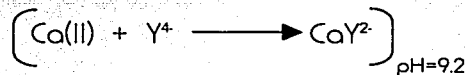
Como ya se mencionó anteriormente, esta titulación se monitoreó con indicador visual NET-NaCl el cual vira de rosa pálido a azul. La reacción de valoración se lleva a cabo en medio básico, el cual se impuso con el uso de una solución amortiguadora de amoniaco (AmBS), $\text{pH}=10$, y a una concentración 2 mol/L. La reacción de valoración se presenta a continuación:



La titulación de la solución se realizó por triplicado, encontrándose una concentración exacta = 0.0108 M

1.2.8.2. Titulación de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 0.01\text{F}$ (Patrón secundario) con CaCO_3 (Patrón primario).

Esta reacción se llevó a cabo con monitoreo micropotenciométrico en presencia de Ag^+ a nivel trazas. Al igual que en el caso anterior, la reacción se lleva a cabo en medio básico, pero a $\text{pH}=9.2$, el cual fue impuesto con una solución amortiguadora de boratos (BBS), $\text{pH}=9.2$ y a una concentración igual a 0.1 mol/L. Esta concentración se logró sometiendo la solución a una sonicación de 15 minutos antes de llevar al aforo. La reacción de valoración es la siguiente:



Hay que tener en cuenta que en el medio de reacción hay presencia de Ag^+ , a concentraciones de indicador, la cual formará complejos con el Y^{4-} cuando este se encuentre en exceso y ya haya reaccionado todo el Ca(II) presente en la solución. Lo cual se denota por una caída del potencial de la solución, registrándose así el punto de equivalencia de la reacción de valoración. Para ejemplificar mejor esto, se presenta en la figura 5 se muestra una escala de reactividad de los cationes en solución frente al Y^{4-} al pH de trabajo.

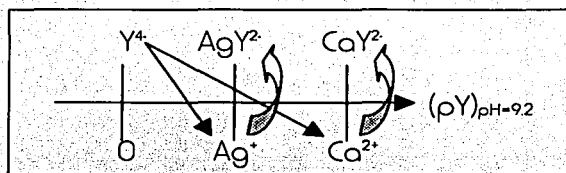
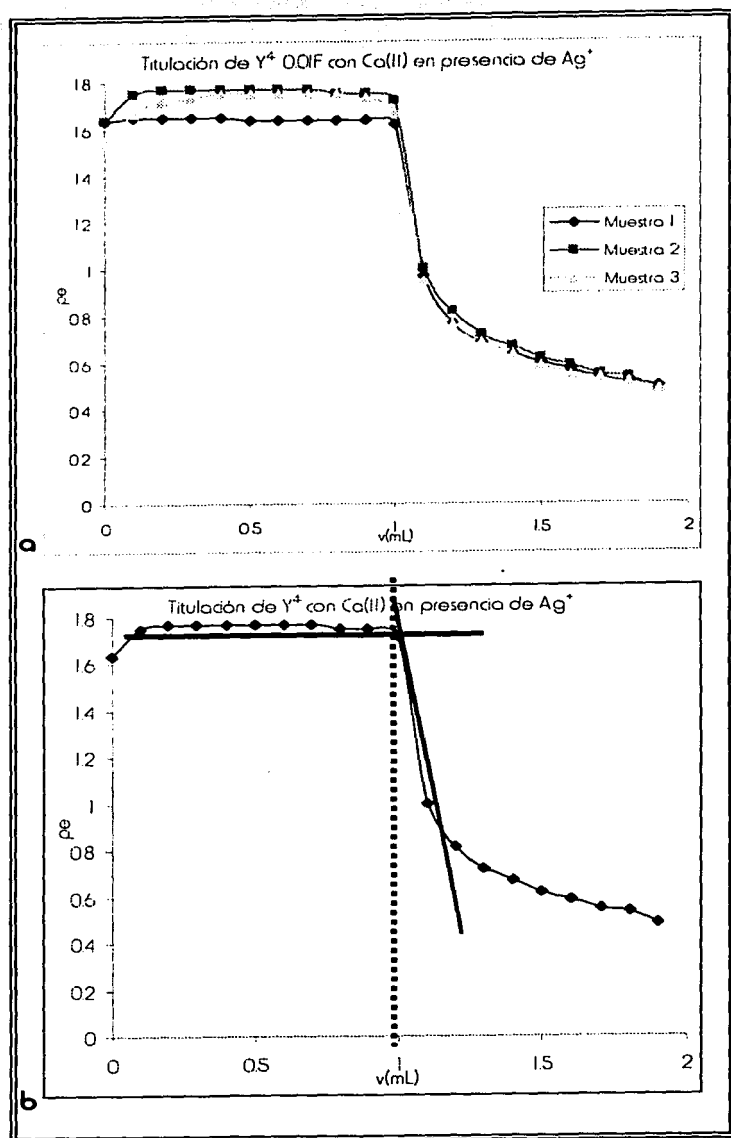


Figura 5. Escala de reactividad de pY de los cationes Ca(II) y Ag^+ frente a Y^{4-} a $\text{pH}=9.2$. Esta escala ayuda a explicar el uso de Ag^+ como reactivo piloto en la titulación de la solución de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 0,01\text{F}$ y monitoreo micropotenciométrico.

Es necesario mencionar que el E_i utilizado fue de Ag° , y el E_{ref} fue de $\text{Cu}|\text{H}_2\text{O}|$. En la gráfica 15a, se muestran los resultados obtenidos en éste experimento. Los diferentes valores de $V_{p.f.}$ fueron calculados como se muestra en la gráfica 15, inciso b.



Gráfica 15. a Curvas de titulación, $p_e = f(v)$, para la normalización de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ 0.01F con CaCO_3 en presencia de Ag^+ . Las diferencias que se presentan al inicio de la valoración se deben a que en cada uno de los ensayos la cantidad de Ag^+ es diferente, o sea, en la Muestra 1 hay más Ag^+ que en la Muestra 2. E_i : Ag° , E_{ref} : $\text{Cu}^\circ|\text{H}_2\text{O}|$. **b** En ésta gráfica se ejemplifica el método gráfico para obtener el $V_{p.f.}$ de cada uno de los ensayos del inciso a. La línea punteada indica el $V_{p.f.}$ encontrado.

1.2.8.3 Determinación de la dureza total de agua mediante valoración volumétrica con $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ 0.02F titulado y monitoreo con indicador visual NET-NaCl

La muestra utilizada fue agua potable la cual se valoró en presencia de AmBS pH=10 e indicador visual NET-NaCl. El titulante fue, como lo indica el título, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ 0.02F titulado con Zn(II). El volumen de muestra fue de 1.0 mL adicionado de 1.0 mL de AmBS pH=10. La dureza total de agua se reporta en partes por millón (p.p.m. = $\mu\text{g}/\text{mL}$) respecto al CaCO_3 , mineral presente en el agua potable e indicador de la dureza de la misma. Un ejemplo del cálculo de la dureza de agua se presenta a continuación:

Datos:

$$C_{\text{EDTA}} = 0.0190 \text{ M}$$

$$P.M._{\text{CaCO}_3} = 100.091 \text{ mg/mmol}$$

$$V_{\text{p.f.}} = 0.75 \text{ mL}$$

A la equivalencia: $n_{\text{CaCO}_3} = n_{\text{EDTA}} = C_{\text{EDTA}} \cdot V_{\text{EDTA}}$

$$n_{\text{CaCO}_3} = (0.0019 \text{ mmol/mL}) \cdot (0.74 \text{ mL}) = 0.0014250 \text{ mmol}$$

$$m_{\text{CaCO}_3} = 0.0014250 \text{ mmol} \cdot \frac{100.091 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} = 0.142629675 \text{ mg CaCO}_3$$

$$\text{p.p.m.}_{\text{CaCO}_3} = 0.142629675 \text{ mg} \cdot \frac{1 \mu\text{g}}{10^{-3} \text{ mg}} = 142.6297 \text{ p.p.m.}$$

El análisis de la muestra se realizó cuatro veces, por lo que a continuación se presenta el promedio de p.p.m. de Ca(II) en forma de CaCO_3 que contiene la muestra:

Dureza de agua potable: **141.7 p.p.m. de CaCO_3**

1.2.9. Valoraciones bifásicas a microescala. Determinación del contenido de Bromhidrato de Dextrometorfano en cápsulas de liberación prolongada.

En la actualidad, los procesos implicados en los equilibrios de intercambio o de distribución entre dos fases están bien estudiados, toda vez que representan el fundamento de los métodos instrumentales de separación cromatográficos. En ésta sección se pretende retomar el fundamento de los equilibrios de distribución y su papel condicionante cuando se encuentran frente a un equilibrio ácido base, tal que al "jugar" con ambos equilibrios simultáneamente se obtenga un aumento de la cuantitatividad de la reacción de valoración, y por consiguiente una aplicación analítica, en particular, la de controlar principios activos en formas farmacéuticas que tengan la característica de ser poco solubles en agua, lo que impide su valoración volumétrica en fase acuosa y requiera tratamientos de muestra como extracciones con disolventes orgánicos en grandes cantidades, repercutiendo en el encarecimiento del análisis, el aumento en la cantidad de solventes orgánicos tóxicos, y lo que es peor, la pérdida de analito a causa del tratamiento de muestra. En esta sección se pretende establecer una técnica alternativa de valoración ácido-base simultánea a un equilibrio de distribución entre dos fases líquidas, o sea, una valoración volumétrica bifásica con monitoreo micropotenciométrico, usando volúmenes de disolventes no mayores a 1.0mL.

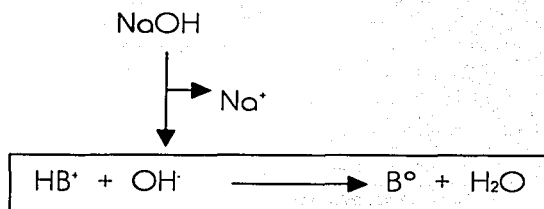
El Bromhidrato de dextrometorfano (HB^+) es un fármaco que tiene actividad antitusiva. Es un isómero del análogo de la codeína levorfanol; sin embargo, a diferencia del otro isómero carece de propiedades analgésicas o de potencial adicción y no actúa sobre los receptores de opiodes. Este fármaco ejerce una acción central para elevar el umbral de la tos. Se ha demostrado su eficiencia en pacientes con tos patológica en estudios controlados; su potencia es casi igual a la de la codeína. En comparación con ésta última, el HB^+ produce menos efectos adversos subjetivos y gastrointestinales. En dosificaciones terapéuticas, no inhibe la actividad ciliar, y sus efectos antitusivos persisten de cinco a seis horas. Su toxicidad es baja, pero a dosis demasiado altas puede producir depresión del sistema nervioso central. El HB^+ es una base poco soluble en agua, de modo que para su valoración se requieren de medios de reacción no acuosos para llevarla a cabo. En este trabajo se realizará la valoración bifásica de HB^+ en medio acuoso en presencia de un disolvente orgánico. Se ensayó el disolvente orgánico Metilisobutil cetona (MIBK). El monitoreo del pH se hará con E_{pa} convenientemente calibrado como electrodo de trabajo, y como E_{ref} $Cu|Cu(II)|$. La solución titulante fue NaOH 0.05F titulada con Biftalato de potasio y monitoreo del $V_{p.f.}$ con indicador visual.

1.2.9.1. Valoración de HB* SRef en medios monofásico y bifásico.

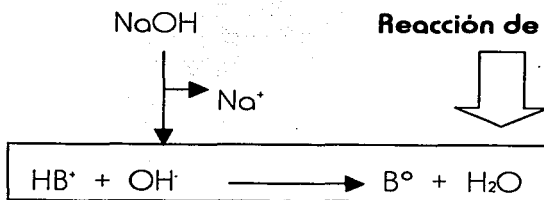
Para conocer el sistema en estudio, se llevó a cabo la valoración de HB* SRef. Los medios utilizados fueron a) Monofásico: Agua, y b) Bifásico: H₂O/MIBK. La valoración fue a través de una volumetría ácido/base, tal cual como se explica en el apartado anterior. Es necesario recordar que los equilibrios de distribución líquido-líquido están condicionados, entre otras cosas, por la relación de volúmenes. Este trabajo está realizado a $p(V_o/V_a)=1$ según lo reportado por J. Ramírez y A. Baeza.^[9]

Los procesos de reacción que ocurren en cada una de las valoraciones de la gráfica 16 se muestran a continuación:

Medio monofásico H₂O:



Medio bifásico H₂O/MIBK:



Reacción de valoración



Equilibrio de distribución colateral

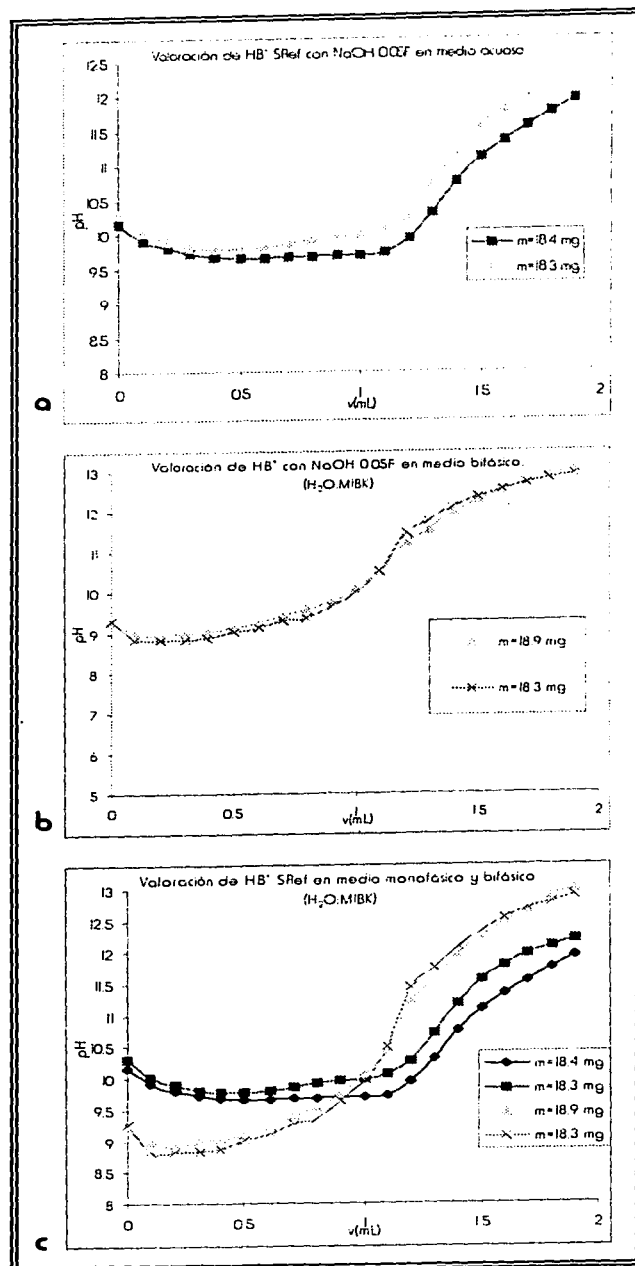


En la gráfica 16 se muestran los resultados obtenidos para cada una de los ensayos realizados. En todos los casos, el V_{p.f.} se determinó con el método de la "Primera derivada". Así mismo, en la tabla X se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la pureza del HB* SRef.

Tabla X. Resultados de la determinación de la pureza de HB^{*} SRef tanto en medio monofásico como bifásico. En la última columna se muestra un análisis de coeficiente de variación de las determinaciones realizadas, según el caso.

Pureza de HB[*] (%)					
N° de ensayo	1	2	3	4	CV (%)
Monofásico	110.0	122.0	123.7	—	6.2931
Bifásico	108.8	117.3	106.1	106.6	4.7408

Gráfica 16. **a** Curva de valoración, $\text{pH}=\text{f}(v)$, de $\text{HB}^+ \text{SRef}$ con $\text{NaOH } 0.05\text{F}$ en agua. La variación en el $V_{\text{p.f.}}$ es debido a la variación de la masa de cada muestra. **b** Curva de valoración, $\text{pH}=\text{f}(v)$, de $\text{HB}^+ \text{SRef}$ con $\text{NaOH } 0.05\text{F}$ en medio bifásico $\text{H}_2\text{O} / \text{MIBK}$, a $p(\text{V}_0/\text{V}_a)=1.0$. La variación en el $V_{\text{p.f.}}$ es debido a la variación de la masa de cada muestra. **c** Se presentan las curvas de valoración de $\text{HB}^+ \text{SRef}$ tanto en medio acuoso como en medio bifásico. Se aprecia el aumento de la cuantitatividad de la reacción de valoración. Para todos los casos: Er:PA , $\text{Eref: Cu}^0 / \{\text{Cu(II)}\}$



1.2.9.2. Determinación de HB* en cápsulas de liberación prolongada en medios monofásico y bifásico.

Como ya se mencionó anteriormente, el HB* es un fármaco antituberculoso. Una de las presentaciones comerciales del mismo es en cápsulas de liberación prolongada. La valoración de éste fármaco es posible realizarla con una valoración volumétrica bifásica al igual que la realizada con la SRef. En éste experimento se determinó el contenido promedio de 10 cápsulas. Las microcápsulas se homogeneizaron en un mortero y se pesó una muestra de análisis tal que contuviese una cantidad del analito capaz de gastar 1.0 mL de titulante, NaOH 0.05F, a la equivalencia. La muestra se valoró tanto en medio monofásico (H₂O) como en medio bifásico (H₂O /MIBK, $p(V_0/V_a)=0$) con monitoreo micropotenciométrico del Vp.f. Las curvas de valoración obtenidas se muestran en la gráfica 17. En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos para la determinación del contenido de HB*, en producto terminado.

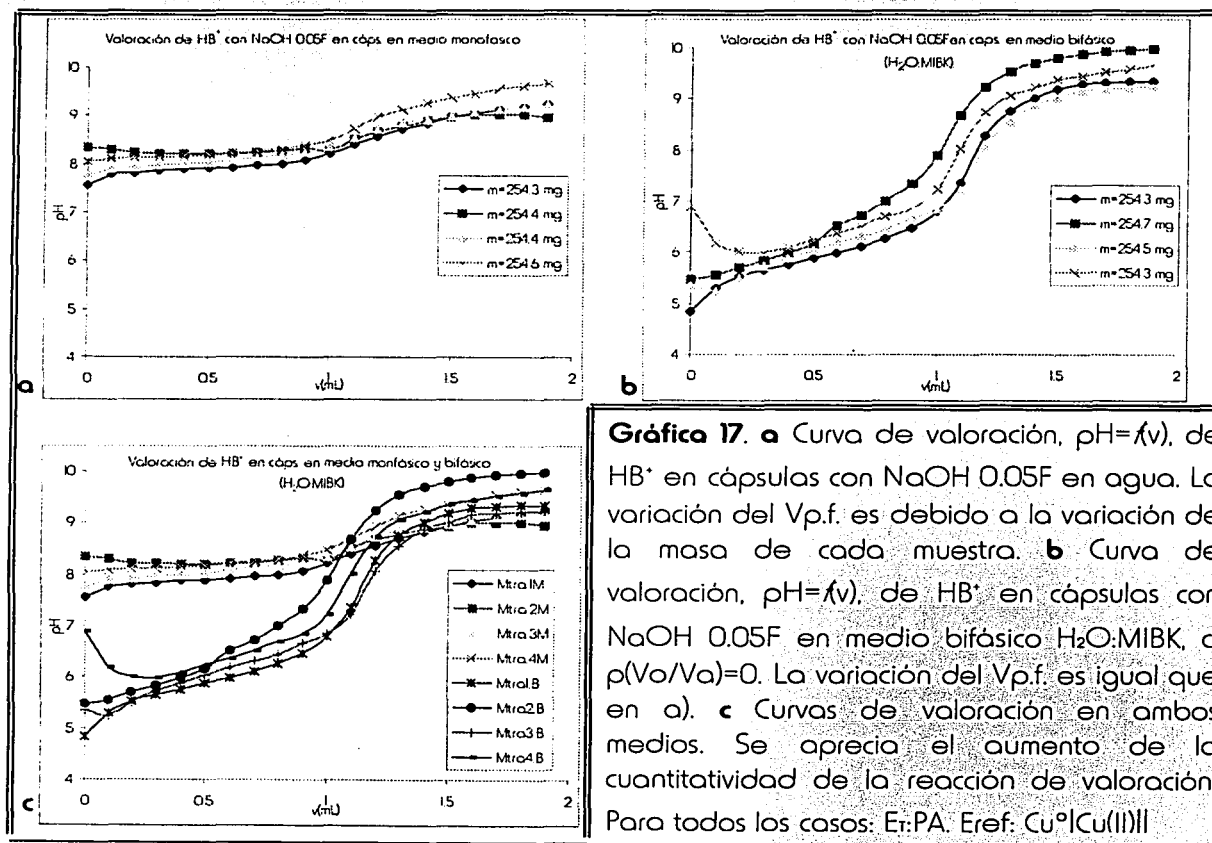


Tabla XI. Resultados de la determinación del contenido de HB* en cápsulas de liberación prolongada tanto en medio monofásico como bifásico. En la última columna se muestra un análisis de coeficiente de variación de las determinaciones realizadas, según el caso.

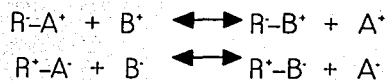
Contenido de HB* respecto al marbete (%)					
N° de ensayo	1	2	3	4	C.V.(%)
Monofásico	96.6	97.5	103.5	101.4	3.2624
Bifásico	108.4	98.3	108.1	101.5	4.8006

Es importante mencionar que en todos los casos, el Vp.f. se determinó con el método de la "Primera derivada".

1.2.10 Determinación de la Capacidad de Intercambio de resinas de intercambio iónico de tipo R-H fuerte con monitoreo micropotenciométrico.

1.2.10.1 Equilibrios de distribución en resinas de intercambio iónico. Resinas de intercambio iónico. Capacidad de Intercambio. Efecto del ión común. ^[20]

Los cambiadores de iones son redes tridimensionales de macromoléculas con ciertas cargas electrostáticas fijas por una unidad estructural. Estas sustancias sólidas pueden tomar iones de una disolución electrolítica y ceder otros iones de la misma carga a la disolución en cantidad equivalente. El proceso de cambio iónico se puede representar por las ecuaciones:



donde R es la sustancia insoluble en agua capaz del cambio iónico, y A y B son los "iones móviles o contrarios". Se denominan "co-iones" a los iones de la disolución con el mismo signo que la carga fija de la red (iones fijos). Un cambiador de cationes puede considerarse como un polianión cristalino y un cambiador de aniones como un polication.

El proceso de cambio iónico es un *equilibrio heterogéneo* al que le pueden aplicar consideraciones termodinámicas y cinéticas. Se caracteriza porque:

- a) Son procesos reversibles (En la mayoría de los casos)
- b) Las reacciones de intercambio tienen lugar de acuerdo con los principios de equivalencia y electroneutralidad
- c) En varios casos, el equilibrio se alcanza con lentitud, por lo que la cinética es un aspecto importante a considerar.

Las *resinas de intercambio* son el material cambiador de iones más utilizado, tanto en procesos cromatográficos como en las separaciones no cromatográficas. Son polímeros orgánicos sintéticos a los que se les incorpora, mediante diversos procedimientos, los grupos iónicos fijos que las convierten en cambiadores. Una resina de intercambio ideal tiene las siguientes características:

- a) Tamaño controlable y uniforme.
- b) Resistencia química y física.
- c) Estructura de gel hidrofílico. (Hinchable)
- d) Alta capacidad de cambio.
- e) Rapidez en alcanzar el equilibrio.
- f) Conservar la capacidad y rapidez con el tiempo.

La capacidad de una resina se refiere a la definición cuantitativa del cambiador: es el número de grupos ionogénicos por cantidad específica de cambiador. La *capacidad de intercambio* en peso (C_i) es el número de mmol por gramo de resina seca que puede intercambiar la misma. Oscila en el intervalo de $0.5 < \text{mmol/g} < 10$.

Para determinar la C_i real de una resina se utiliza una técnica volumétrica. La técnica habitual de valoración es con sal añadida, logrando así el *efecto del ión común*. Si una resina en forma R-H se suspende en una disolución, ésta queda ácida por acción del intercambio. Si la disolución se valora como se ha descrito anteriormente, la representación gráfica del proceso es muy similar a la de una valoración de un ácido fuerte con una base fuerte. La C_i corresponde al punto de inflexión.

1.2.10.2 Determinación de la C_i de una resina de tipo R-H fuerte. Monitoreo por indicador visual.

La resina de tipo R-H utilizada tiene una C_i nominal igual a 3.6 mmol/g. Para la determinación de la C_i real de la resina, se valoró una masa de la misma, calculada a partir de la C_i nominal, para que gastase 1.0 mL de NaOH patrón secundario, previamente titulado, a la equivalencia y en presencia de NaCl. El monitoreo del Vp.f. se llevó a cabo con indicador visual fenolftaleína. Previo al inicio de la valoración, la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos para permitir el intercambio iónico. Se realizaron cuatro réplicas, se obtuvo la C_i promedio y se calculó el C.V. La C_i encontrada por éste método fue de.

$$C_i = 3.67 \text{ mmol/g}$$

Con indicador visual

1.2.10.3 Determinación de la C_i de una resina de tipo R-H fuerte. Monitoreo micropotenciométrico.

Así como la determinación C_i se realizó con monitoreo con indicador visual, es posible realizarla con un monitoreo potenciométrico, toda vez que se trata de una reacción de valoración de tipo ácido-base. Para poder determinar la C_i de la resina, nuevamente se valoró una masa de la misma, calculada a partir de la C_i nominal, para que se gastase 1.0 mL de NaOH patrón secundario, previamente titulado a la equivalencia y en presencia de NaCl, y monitoreando el curso de la valoración con un E_{PA} previamente calibrado, y como $E_{ref} \text{ Cu|Cu(II)}$. En la gráfica 18 se muestran las curvas de valoración, $pH=f(v)$, para la determinación de la C_i de la resina en cuestión.

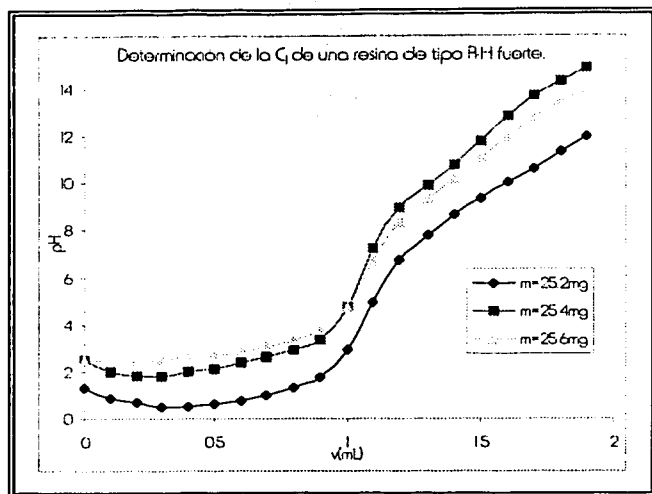


Gráfico 18. Curva de valoración $pH=f(v)$, para la determinación de la C_i de una resina tipo R-H fuerte. La variación en el Vp.f. se debe a la variación de la masa de resina valorada. En los tres casos: $E_t: PA$, $E_{ref}: Cu[Cu(II)]$.

Par determinar el Vp.f. de cada una de las curvas de valoración presentadas en la gráfica 18, se recurrió nuevamente al método de la "Primera derivada". Finalmente, con el Vp.f. se calculó la C_i de cada ensayo, posteriormente el promedio y finalmente el C.V. La C_i encontrada para la misma muestra, por éste método fue de.

$$C_i = 3.81 \text{ mmol/g}$$

Con monitoreo micropotenciométrico

En la tabla XII se muestra, a manera de comparación, los resultados obtenidos y los C.V. encontrados para cada una de las variantes de este experimento.

Tabla XII. Resultados de la determinación de la C_i de la resina analizada. Se muestra en la última columna un análisis de coeficiente de variación de las determinaciones realizadas, según el caso.

Sistema de monitoreo	C_i (mmol/g)	C.V. (%)
Indicador visual	3.67	0.3149
Micropotenciométrico	3.81	1.8605

1.3 Potenciometría. Valoraciones por curva de calibración.

1.3.1 Determinación de cloruros en suero.

1.3.1.1 Importancia clínica de los cloruros. Enfoques de laboratorio. ^[21]

El ión cloruro (Cl⁻) es el anión principal en el espacio del líquido extracelular. En un adulto normal, los cloruros totales representan alrededor de 30 mmol/Kg de peso. Aproximadamente el 88% de los cloruros son encontrados en el espacio del líquido extracelular, y el 12% en el espacio del líquido intracelular, y aproximadamente el 14% del total de los cloruros del cuerpo se encuentran en el plasma, 27% en fluido intersticial, el cual es accesible al plasma. Nótese que la concentración de cloruros en el fluido intersticial es mayor que en el plasma, mientras que las concentraciones de sodio y potasio son menores en el mismo. Estas diferencias entre el plasma y el fluido intersticial son causadas por el equilibrio de Gibbs-Donnan. Los cloruros son distribuidos a través de la membrana celular mediante un transporte pasivo. La diferencia en la concentración de cloruros entre el fluido intersticial y el líquido intracelular es causada por la diferencia de potencial eléctrico. La cantidad de cloruros en el cuerpo es un reflejo del balance entre la ingesta de cloruros y la eliminación del mismo. En condiciones normales, un adulto en promedio ingiere alrededor de 50 a 200 mmol de cloruros/día. La eliminación de cloruros se realiza por tres vías: el tracto gastrointestinal, la piel y el tracto urinario. La principal vía de excreción de cloruros es a través del riñón.

Hipercloremia. La acumulación de cloruros ocurre cuando la ingesta de cloruros excede a la eliminación de los mismos, debido a una alteración en los mecanismos de homeostasis de los cloruros. Para la mayoría de los casos, las causas de la retención de cloruros son las mismas que en la retención de sodio. Sin embargo, existe una condición clínica en la cual el exceso de cloruros puede no estar asociado con el exceso de sodio: algunos tipos de acidosis metabólica. El incremento de la concentración de cloruros es causado por la reabsorción de una porción relativamente grande de cloruros y sodio que de bicarbonato (HCO₃) a nivel de los túbulos renales.

Hipocloremia. La disminución de cloruros ocurre cuando la eliminación de cloruros supera a la ingesta de los mismos. Para la mayoría de los casos, las causas de la disminución de cloruros son las mismas que en la disminución de sodio. Sin embargo, en una condición clínica, la alcalosis metabólica hipoclorémica, puede haber disminución de cloruros sin que curse con disminución de sodio, habitualmente de la pérdida anormal de fluido gástrico.

Como se puede observar, es común que las concentraciones en plasma de cloruros cambien paralelamente con las concentraciones de sodio. Las principales excepciones a estos cambios paralelos, ocurren durante la acidosis y la alcalosis metabólica crónica. En otras palabras, la acidosis metabólica puede no estar asociada con hipernatremia; la alcalosis metabólica puede no estar asociada con hiponatremia.

1.3.1.2 Determinación de cloruros en el laboratorio clínico.

Los métodos de cuantificación de cloruros en muestras biológicas se basan en la baja solubilidad del ión cloruro combinado con iones plata o mercurio para formar AgCl o cloruros de mercurio.^[22] Los métodos actualmente disponibles para el uso del laboratorio clínico, en análisis de rutina, caen dentro de tres categorías: colorimétricos, coulombimétricos y potenciométricos, con el uso de electrodos ión-selectivos (ISE). El método colorimétrico^[23] de uso común se basa en la habilidad que presenta el ión cloruro en desplazar al ión tiocianato en el tiocianato de mercurio.

Otro método usado para cuantificar cloruros, es la titulación coulombimétrica.^[24] Este método se basa en la generación de iones Ag^+ por medio de un potencial impuesto a un electrodo de Ag^0 el cual está sumergido dentro de la muestra. Dichos iones Ag^+ reaccionan con los iones cloruro presentes para producir AgCl , el cual es insoluble. El punto final de la titulación es detectado amperométricamente por un segunda par de electrodos tan pronto como se incrementa la cantidad de iones Ag^+ libres, lo cual ocurre, obviamente, cuando los iones cloruro ya han sido consumidos. Es importante mencionar, que éste método de cuantificación, es aceptado como un método de referencia.

Finalmente, el método más común y utilizado actualmente para la determinación de cloruros en el laboratorio clínico, es el uso de ISE's a cloruros. El elemento selectivo a cloruros es, usualmente un electrodo de Ag^0 recubierto de AgCl . Otra técnica para el análisis de cloruros, que se ha descrito recientemente, está basado en la determinación de cloruros dependiente de la actividad de la α -amilasa,^[25] sin embargo aun se encuentra en investigación y no se realiza de forma rutinaria en el laboratorio clínico.

Es importante mencionar que todos los métodos para la determinación de cloruros descritos anteriormente presentan una interferencia positiva de otros iones halógenos. El único halógeno clínicamente importante en la determinación de cloruros es el ión bromuro (Br) el cual es administrado como componente químico de ciertos principios activos. Aunque el bromuro interfiere en todas las metodologías de cuantificación de cloruros, es en el uso de ISE el cual se ha reportado una mayor vulnerabilidad a la interferencia de éste ión.^[26]

La determinación de cloruros con fines clínicos, pueden ser realizadas en diferentes fluidos biológicos, como son la orina, el suero, el plasma heparinizado, entre otros. En la determinación en suero es importante tener en cuenta que el suero debe ser separado de las células rojas de la sangre lo más pronto posible, ya que los cambios de pH en la muestra pueden alterar la distribución de los cloruros entre las células y el suero.

1.3.1.3 Construcción del electrodo selectivo para cloruros.

Para la realización de éste experimento, se construyó un ISE a cloruros. Se tomó en cuenta que un electrodo de Ag recubierto de AgCl es selectivo a éste ión. Para ello se montó la celda de electrólisis mostrada en la figura 6. Se sumerge un alambre de Ag libre de óxidos en una solución de HCl 0.1F, conectado al polo positivo de una batería de 9 V. El circuito es cerrado con un electrodo de cobre cilíndrico conectado al polo negativo de la misma batería. Se realiza la electrólisis durante 20 s aproximadamente, obteniendo al final una capa de AgCl alrededor del alambre de Ag.

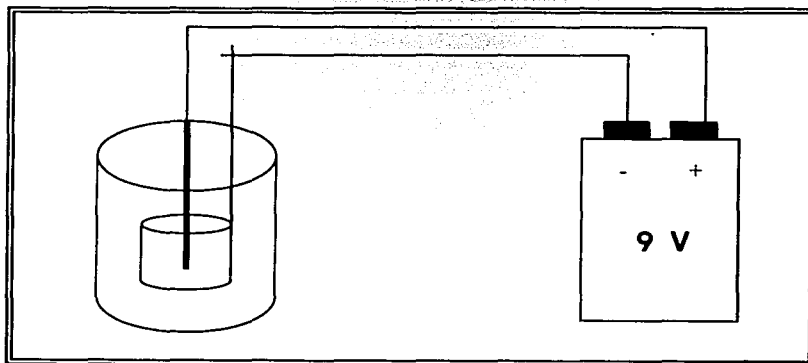


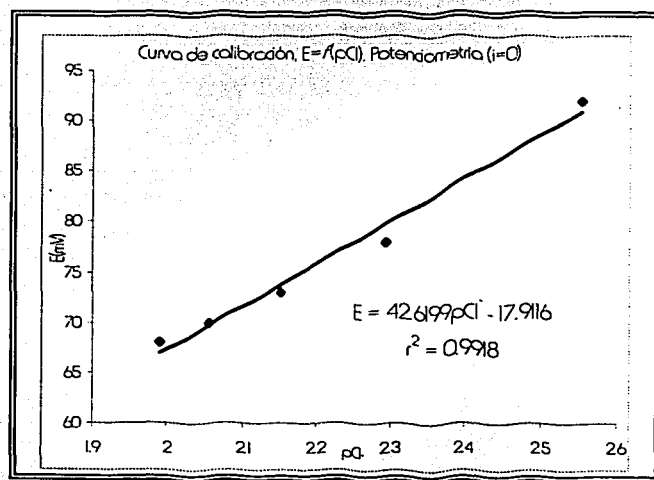
Figura 6. Celda de electrólisis para la síntesis del ISE a cloruros.

1.3.1.4 Determinación de cloruros en suero. Técnica operatoria: Potenciometría (i=0). Metodología analítica: Curva de calibración $E=f(pCl)$

Antes de entrar de lleno a la discusión de los resultados de este apartado, es pertinente recordar el significado del operador "p". Nótese en el título anterior, que la Curva de calibración es una gráfica en función de "pCl". (léase p de cloruro), que al igual que el parámetro "pH" se refiere como al logaritmo inverso aplicado a un guarismo. En este caso, el operador p se aplica a la concentración (en mol/L) de cloruros, en otras palabras:

$$pCl = \log \frac{1}{C_{Cl}} = - \log(C_{Cl})$$

Para la construcción de la curva de calibración, se prepararon cinco soluciones de KCl de diferente concentración, en el intervalo $1.9 < pCl < 2.6$. Se colocó el ISE construido dentro de la solución junto con Eref de $Cu|H_2O||$. Se midió la potencial de la solución con estos electrodos durante 20 s. Para hacer la curva de calibración, se gráfico el valor de E medido (en mV) en función de pCl. La curva de calibración obtenida se muestra en la gráfica 19.



Gráfica 19. Curva de calibración, $E=f(pCl)$ para la determinación de cloruros en suero. Er: ISE a cloruros a base de $Ag^0|AgCl$. Eref: $Cu|H_2O||$

Se analizaron cuatro muestras de voluntarios adultos sanos. Se tomó una muestra de sangre total (aproximadamente 6 mL) sin anticoagulante por medio de punción venosa. Una vez ocurrida la retracción del coágulo, la muestra se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. Concluida la centrifugación, se separó el suero del coágulo. Para realizar la determinación de cloruros, se tomó un volumen de 100 μL de suero y se diluyó con 1000 μL de KNO_3 0.01F. La disolución se homogeneizó por medio de agitación mecánica durante 10 s aproximadamente. Se suspendió la agitación y se midió el potencial de la disolución de la muestra con los mismos E_i y E_{ref} usados en la curva de calibración. El potencial medido de cada muestra se evaluó en la ecuación de la curva de calibración, y considerando la dilución, se determinó la cantidad de cloruros en las muestras. En la tabla XIII se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas. En la tabla XIII se muestran también los valores de referencia para cloruros séricos (en mol/L), de dos fuentes bibliográficas diferentes.

NOTA. Los valores de referencia mostrados en la tabla XIII fueron realizados en población estadounidense, por lo que dichas referencias no deben de ser tomadas con la seriedad habitual de la clínica.

Tabla XIII. Resultados de la determinación de cloruros en suero en voluntarios adultos sanos con el ISE en condiciones de microescalamiento. Nótese que en la mayoría de las muestras, solo se detecta aproximadamente el 50% de los valores de referencia. Ver Nota 1.

N° de muestra	E(mV)	C_a (mol/L)	Valores de referencia
1	75	0.0727	0.101 < M < 0.111 ^[27]
2	80	0.0555	
3	81	0.0526	0.098 < M < 0.107 ^[28]
4	80	0.0555	

Como se mencionó, no se encontraron concentraciones de cloruros dentro de los valores de referencia utilizados. Es bien sabido por los Químicos Clínicos, que cuando se ha desarrollado un nuevo método de análisis, o se ha hecho alguna modificación a algún método de rutina, se tienen que determinar los nuevos valores de referencia para el método en cuestión, así como compararlo con el método de referencia oficial (que puede variar de acuerdo a la región). Para éste trabajo, se propone comparar los resultados con el método coulumbimétrico, como método de referencia en trabajos posteriores.

1.3.2 Determinación de glucosa en suero

1.3.2.1 Importancia de la determinación de glucosa. Enfoques de laboratorio. ^[29]

1.3.2.1.1 Glucosa. ^[30]

Químicamente, la glucosa (glu) es una aldohexosa cuya forma aldehído está en equilibrio con la forma glucopiranososa. Esta última es la favorecida por el pH fisiológico. El equilibrio aldehído-enodiol permite que la glu sea reducida y oxidada con facilidad. La función bioquímica principal de la glu es proveer de energía a los procesos de la vida. La oxidación de la glu, ya sea por la vía glucolítica (Glucólisis) o por la vía de los Ácidos Tricarboxílicos (Ciclo de Krebs), es la fuente primaria de energía para la biosíntesis de Adenosin Trifosfato (ATP). Otras fuentes alternas de energía son los aminoácidos y ácidos grasos que también pueden producir ATP, vía el Ciclo de Krebs.

Cuando existe un exceso de glu, ésta es almacenada en forma de un polímero denominado glucógeno. Para posteriores demandas de energía. El glucógeno está localizado en gránulos dentro del citoplasma de células hepáticas y musculares.

Regulación hormonal del metabolismo de la glu.^[31]

El sistema para regular los niveles de glu en sangre está diseñado para que ésta alcance dos destinos finales. El primero, es almacenar el exceso de glu en un reservorio compacto listo para las necesidades energéticas inmediatas del cuerpo: el **glucógeno**. El segundo, es la movilización de la glu almacenada con el propósito de mantener los niveles de glu en sangre. La regulación de la glu sanguínea es esencial para mantener las funciones cerebrales. El papel de la **insulina** es colocar a la glu extracelular en sitios de almacenamiento intracelular en forma de macromoléculas (Glucógeno, grasas y proteínas). Así, la glu es almacenada en periodos de plenitud o abundancia para los periodos de carestía. La insulina es sintetizada en el páncreas endocrino por las células beta de los islotes de Langerhans en forma de un precursor de alto peso molecular llamado proinsulina.^[32]

Como respuesta a las bajas concentraciones de glu en sangre, como los que ocurren durante el ayuno, una serie de agentes hiperglucemiantes actúan sobre vías metabólicas intermediarias para formar glu a partir de las macromoléculas de las reservas. Esta glu sintetizada *de novo* es liberada hacia la sangre para mantener los niveles de glu sanguíneos. Los agentes hiperglucemiantes más importantes son el **glucagon**, epinefrina, cortisol, tiroxina, la hormona del crecimiento y algunas hormonas intestinales. El glucagon es una hormona polipeptídica de 3500 Da que es sintetizada en las células alfa del páncreas.^[33] Nótese que mientras la insulina promueve el metabolismo anabólico, estas hormonas inducen el metabolismo catabólico. La insulina inhibe la proteólisis, lipólisis y la gluconeogénesis y la glucogenólisis y estimula la síntesis de lípidos y la glucogenogénesis en el hígado. Una comida rica en carbohidratos induce la secreción de insulina y suprime la liberación de glucagon. La hipoglucemia estimula la liberación de glucagon. El resultado neto es la homeostasis de la glu.

1.3.2.1.2 *Desordenes en el metabolismo de carbohidratos*^[34]. *Diabetes*

Los diversos desordenes que se presentan en el metabolismo de carbohidratos puede ser agrupados dentro de varias categorías. Los cuales dependen principalmente de los hallazgos realizados en el laboratorio. Estos hallazgos están asociados con: 1) Hiperglucemia, 2) Hipoglucemia y, 3) Concentraciones normales o ligeramente disminuidas de glucosa en plasma, pero con la excreción de azúcares reductores diferentes de glucosa en la orina.

Cuando la regulación hormonal de la glu en sangre y los procesos metabólicos en los que esta participa son anormales en pacientes diabéticos, se presenta el signo clásico de la diabetes mellitus: la hiperglucemia.

Durante el ayuno, el glucógeno hepático es degradado como una fuente de glu. Justo minutos después de la ingestión de alimento, los niveles de insulina en sangre se incrementan rápidamente. Sin embargo, aproximadamente el 80% de la glu ingerida no es insulino-dependiente, ya que el cerebro, el hígado, los eritrocitos y los intestinos no requieren de insulina para incorporar glu a partir de sangre en presencia de niveles elevados de la misma. El tejido insulino-dependiente más importante, es entonces el muscular. En el paciente diabético, tanto la producción como el metabolismo de la glu se encuentran incrementados.^[31,35] Así, durante el estado de ayuno, la glucosa hepática es liberada en grandes proporciones, causando el diagnóstico (Dx) de diabetes: hiperglucemia en ayunos.

La diabetes mellitus no es una entidad patológica única bien definida, sino que es un Sx, un conjunto de signos y síntomas, causados por cualquiera de los diferentes desordenes en las glándulas endocrinas y que cursa con las siguientes características: concentración de glucosa plasmática elevada, deficiencia absoluta o relativa de insulina y la probabilidad de que se presenten complicaciones durante un periodo de tiempo. La glucosuria puede estar o no presente. Estudios realizados por epidemiólogos han demostrado claramente que la diabetes mellitus se desarrolla a partir de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales.^[36,37]

Clasificación de la Diabetes Mellitus

En 1979, el Grupo Nacional de registro de Diabetes, perteneciente a los Institutos Nacionales de Salud (NIH por sus siglas en inglés) de Estados Unidos de América, desarrolló un esquema de clasificación de diabetes mellitus y otros tipos de intolerancia a la glu basado en los conocimientos actuales de la bioquímica de la enfermedad.^[38]

1. Diabetes Tipo I o Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente.

La Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente (DMID) es causada por una secreción insuficiente de insulina, denominada insulinopenia. La administración de insulina parenteral es necesaria para mantener el metabolismo normal de la glu. Los individuos con DMID están propensos a padecer cetoacidosis (cetonemia, cetonuria y acidosis), de tal modo que se presenta diuresis osmótica, con una pérdida importante de agua y electrolitos. Otras complicaciones de la DMID incluye el desarrollo de cataratas, neuropatía, y angiopatía. También puede existir hipercolesterolemia e hiperlipidemia. En las etapas finales de la enfermedad se puede presentar una o más de las siguientes complicaciones: parálisis, infarto al miocardio, pérdida de la visión, insuficiencia renal o deficiencias neurológicas. Muchos de los pacientes con DMID desarrollan complicaciones serias, a pesar de la terapia con insulina parenteral, entre 10 y 15 años. Las infecciones virales han sido consideradas como factores de inicio como una causa autoinmune de DMID. Estudios epidemiológicos reportan una incidencia de DMID ^[37, 39] que coincide con la ocurrencia de infecciones virales como paperas, sarampión y rubéola, con el subsiguiente desarrollo de este tipo de diabetes. ^[40,41]

2. Diabetes Tipo II o Diabetes Mellitus No Insulino-Dependiente.

La Diabetes Mellitus No Insulino-Dependiente (DMNID) no tiene ninguna correlación con los niveles de insulina en sangre. Se establece usualmente, después de los 40 años de edad. Por lo general no depende de la administración de insulina parenteral, es menos propenso al padecer cetoacidosis y habitualmente está relacionada con la obesidad.

3. Diabetes Secundaria.

La diabetes mellitus causada por otras condiciones y enfermedades es llamada diabetes secundaria. Ésta puede ser causada por enfermedad pancreática, acromegalia, Sx de Cushing, Feocromocitoma, Glucagonoma, Somatostatina, Aldosterismo primario, Enfermedades hepáticas severas, y la administración de ciertos fármacos, hormonas y químicos.

4. Diabetes Gestacional

La diabetes gestacional se refiere a la diabetes que ocurre temporalmente durante el embarazo. Habitualmente el Dx ocurre durante la segunda mitad del embarazo debido a los resultados anormales de algunas pruebas de laboratorio (glucosuria, hiperglucemia y prueba anormal de tolerancia a la glucosa). La secreción elevada de la hormona placental inhibe la acción de la insulina. Cuando una mujer diabética está embarazada, la enfermedad puede ser más severa hacia finales de la gestación por la misma razón. La hiperglucemia debe de ser prevenida, debido al peligro para el feto. Los riesgos que se incrementan, incluyen el aborto espontáneo,^[42] maduración retardada de pulmones, hiperplasia de células beta del páncreas, algunas malformaciones y macrosomía.^[43]

De los cuatro tipos de diabetes descritos anteriormente, los más importantes siguen siendo la DMID y la DMNID, tanto por sus efectos, como por la frecuencia en la población. A manera de resumen:

"Al parecer la DMIN es causada comúnmente por una destrucción de las células pancreáticas como resultado de una respuesta autoinmune secundaria a una infección viral, mientras que muchos casos de DMNID son causados por un defecto en los receptores celulares para insulina, o afecta los procesos que ocurren posterior a la unión de la hormona. Otras causas son raras."

1.3.2.1.3 Enfoques de laboratorio en la determinación de glu.

La aplicación de los medios que dispone el laboratorio a pacientes con diabetes puede ser comprendida más fácilmente cuando se examinan las situaciones clínicas en las cuáles una diabético recibe atención médica. Estas son: el *Dx* de la diabetes, el *tratamiento* de las complicaciones agudas de la diabetes, y la *vigilancia* del control de la glucemia durante un tratamiento prolongado.

Dx. La mayoría de los diabéticos tipo I son reconocidos como tales cuando son atendidos en una sala de emergencias cursando con una cetoacidosis diabética, o cuando desarrollan polidipsia, poliuria y/o polifagia, usualmente acompañada de pérdida de peso. El Dx requiere de mediciones exactas de glu en sangre, pH, ácido acetoacético, β -hidroxibutirato, cetonas y electrolitos.

Los diabéticos tipo II también pueden ser identificados inicialmente cuando cursan con los síntomas clínicos de un diabético tipo I recientemente diagnosticado. En estos casos, la glucosuria elevada (determinada por tiras reactivas) y una glucosa sanguínea en ayunas elevada serán suficientes para establecer el Dx. Sin embargo, muchos diabéticos tipo 2 con hiperglucemia y síntomas clínicos leves pueden requerir estudios de laboratorio más extensos para un Dx definitivo. Los diabéticos con resultados anormales limitrofes requieren la repetición de los ensayos. Para un Dx definitivo, puede realizarse una prueba de tolerancia a la glu.

Complicaciones agudas de la Diabetes Mellitus^{37, 44}

Como ya se había mencionado, las principales complicaciones de la diabetes mellitus son: Retinopatía, Neuropatía, Angiopatía, susceptibilidad a infecciones, hiperlipidemia, aterosclerosis, cetoacidosis y coma no cetósico hiperglucémico hiperosmolar (HHNC). A excepción de éste último, todas las complicaciones anteriores son más frecuentes para pacientes con DMID que pacientes con DMNID.

La hipoglucemia causa numerosos problemas neurogénicos, que van desde un ligero hasta un coma severo, ataque y muerte. Este desorden que amenaza la vida, casi siempre es el resultado del tratamiento de la hiperglucemia con insulina. Otras complicaciones de la diabetes mellitus es la hipovolemia asociada al coma hiperosmolar y a la cetoacidosis, que puede resultar en shock e insuficiencia renal. En pacientes con cetoacidosis puede presentarse edema cerebral. Los pacientes con cetoacidosis diabética y HHNC pueden cursar con aumento sérico de electrolitos, o bien pueden ser normales o bajos, pero usualmente presentan un déficit de potasio.

Vigilancia del control de glu.

La glu plasmática en ayunas, así como la glu en orina son los marcadores más utilizados para seguimiento de la diabetes mellitus, sin embargo, la glu en orina es un marcador pobre de ésta enfermedad. El propósito en la terapia de pacientes diabéticos es mantener el nivel de glu tan normal como sea posible con el fin de minimizar las complicaciones agudas y largo plazo de la enfermedad, evitando el riesgo de presentar una hipoglucemia severa. Así, la vigilancia realizada en las clínicas consiste en el seguimiento de los niveles de glu en sangre para detectar evidencias de hiper e hipoglucemia. Una prueba importante es la medición de proteínas glucosiladas. De acuerdo con los resultados de las mediciones de glu es posible modificar el tratamiento para permitir de esta manera que el paciente llegue a un estado euglucémico.

1.3.2.2 Métodos de determinación de glucosa.

Los métodos más antiguos para la determinación de glu sérica estaban basados en la capacidad de la misma para reducir directamente a los iones cúpricos (Cu(II)) a iones cuprosos monovalentes (Cu(I)). Por calentamiento, el ión Cu(I) puede formar Cu_2O , el cual puede ser detectado por diversos métodos. El más usado ha sido la reducción del fosfomolibdato (Folin-Wu), o arsenomolibdato (Nelson-Somogyi) formando compuestos azules de molibdeno. La necuprina también puede ser reducida por el ión Cu(I) formando un complejo intensamente colorido, que si bien es un método más sensible que los anteriores, también carece de especificidad. Actualmente, solo unos pocos laboratorios utilizan éstos métodos, por lo que su importancia es meramente histórica. La modificación de Benedict de la reducción del cobre aun se emplea, pero solo con fines semicuantitativo o para estimar la cantidad de glu en orina. Actualmente se comercializa en tiras reactivas con monitoreo colorimétrico. Cuanto mayor es la cantidad de glu en orina, más intenso será el color final de la tira.

Los procedimientos más usados para el análisis de glu emplean enzimas como reactivos para aumentar la especificidad analítica. Estas son las reacciones con Glucosa Oxidasa (GOD) y con Hexocinasa (HK), ambos procedimientos han sido automatizados obteniéndose una especificidad, exactitud y precisión elevadas. El método de la HK incluye dos reacciones acopladas. Si bien otras hexosas pueden interferir en la reacción con la HK, las concentraciones normales de estos carbohidratos no causan una interferencia significativa. La prueba de la HK no se realiza habitualmente como procedimiento cinético debido a que requiere una lectura inicial rápida. Otro procedimiento enzimático para determinación de glu utiliza la enzima glucosa deshidrogenasa, obtenida a partir de *Bacillus megaterium* o *B. cereus*.^[45]

La glu también puede ser medida por fragmentografía de masas.^[46] La muestra se mezcla con glu marcada con deuterio y es sometida a un haz de iones que rompen la glu en fragmentos específicos. La concentración de glu en la muestra se mide por la relación de los fragmentos de la glu sin marca y los de la glu marcada con deuterio.

El procedimiento de la HK usando como muestra un filtrado libre de proteínas fue propuesto como estándar de su clase para la determinación de glu.^[47]

1.3.2.3 Uso de glucosa oxidasa como elemento bioselectivo ^[48]

La enzima GOD ha sido utilizada tanto en métodos colorimétricos como en electroquímicos, el cual ha recibido el nombre equivocado de método polarográfico, ya que no se trata de una polarografía. (Mas adelante se hace evidente el porque no se trata de un método polarográfico). La mayoría de las preparaciones de GOD para utilizarse como reactivo en la determinación de glu incluyen a la enzima llamada mutarotasa, la cual convierte a la α -D-glucosa en β -D-glucosa. Este paso es necesario porque la GOD es específica para solo para la β -D-glucosa. La reacción que cataliza la GOD es:



La determinación "polarográfica" de glu con electrodo de oxígeno y GOD permite un modo rápido de determinación de glu. En este método, la glu reacciona con oxígeno en una reacción catalizada por GOD, con la producción de Ácido glucónico y H_2O_2 . El H_2O_2 es eliminado por una reacción acoplada con catalasa. La cantidad de oxígeno consumida es medida por el electrodo de oxígeno y la cual es directamente proporcional a la concentración de glu en la muestra. La determinación colorimétrica se basa en acoplar la reacción de la GOD con una segunda reacción catalizada por enzima. El H_2O_2 producido por la reacción con GOD se hace reaccionar con algún colorante catalizado por peroxidasa de rábano, obteniéndose un colorante oxidado que presente color. Sin embargo este procedimiento presenta interferencias de diversos compuestos presente tanto en suero como en orina, como son al ácido ascórbico, ácido úrico y bilirrubina. Estas sustancias pueden ser oxidadas por el H_2O_2 dando lugar a resultados falsos negativos.

El uso de la reacción de GOD ha sido automatizado en una variedad de instrumentos y también ha sido adaptado al uso de tiras reactivas para orina, en donde el método es altamente específico para glu. Sin embargo, sustancias oxidantes fuertes como el hipoclorito de sodio pueden producir falsos positivos.

1.3.2.4 Determinación de glu en suero. Técnica operatoria: Potenciometría (i=0). Metodología analítica: Curva de calibración E=f(pglu)

La glu se puede medir en diferentes fluidos corporales. ^[48] Suero, plasma, LCR y orina son las muestras aceptables. La glu en sangre total a temperatura ambiente, es metabolizada a razón de 5% por hora, por lo tanto, las muestras deben ser centrifugadas tan pronto como sea posible para separar la muestra del paquete celular. Los anticoagulantes comunes como oxalato, heparina, EDTA, citrato o fluoruro no causan interferencia en el análisis. Una vez separada, la glu en suero o plasma es estable aproximadamente tres días a una temperatura de 2° a 8° centígrados.

En esta sección se proponen tres métodos diferentes para la determinación de glu en suero, todas ellas basadas en la reacción de GOD. En este capítulo se describe una técnica potenciométrica a corriente nula en condiciones de microescalamiento.

La actividad de la GOD (Sigma) fue evaluada por la técnica de VC, resultados que se discuten en el capítulo de Cronoamperometría y polarografía analítica. Una vez comprobada la actividad de la enzima, se preparó una solución de GOD a una concentración de 15 mg/mL. Se preparó una solución de D-glu 0.01F. El medio de reacción, fue Buffer de Fosfatos (PBS) pH=7.4. Los electrodos utilizados fueron: Er: W, Eref: Cu|Cu(II)||. Se prepararon soluciones de glu en PBS de diferentes concentraciones, en presencia de GOD de acuerdo a la tabla XIV. El potencial de cada una de las soluciones fue medido con los electrodos mencionados durante un tiempo de 20 s.

Para la preparación de las soluciones de la tabla XIV fue necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos operatorios:

- a) La solución de GOD se mantuvo en hielo para conservar la viabilidad de la enzima.
- b) Una vez realizadas las mezclas de la tabla XIV se permitió que ocurriese la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- c) La solución PBS se saturó de oxígeno con una bomba de aire durante 15 minutos, previo a la utilización de la misma.

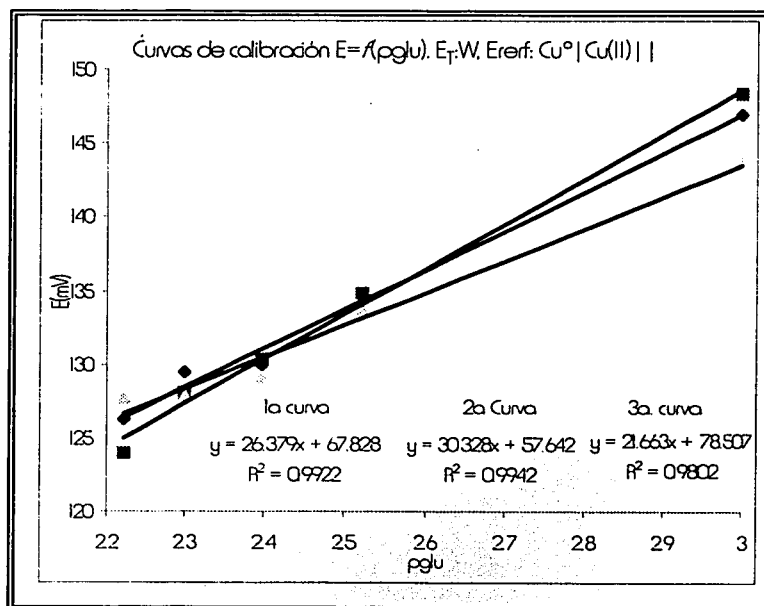
Tabla XIV. Soluciones para la curva de calibración de glu en presencia de GOD.

N° de pozo	1	2	3	4	5
Cglu (M)	0.001	0.003	0.004	0.005	0.006
glu 0.01F (μL)	100	300	400	500	600
GOD 15mg/mL (μL)	100	100	100	100	100
PBS (μL)	800	600	500	400	300

Es importante hacer notar el orden de magnitud de los volúmenes utilizados. Las soluciones fueron realizadas simultáneamente en placas para ELISA. Nótese que en todos los casos, el volumen total de reacción es de 1.0 mL.

Se ensayaron tres electrodos de W diferentes, por lo que se obtuvieron tres curvas de calibración, $E = f(\text{pglu})$, que son mostradas en la gráfica 20.

Gráfica 20. Curvas de calibración, $E = f(\text{pglu})$, para la determinación de glu en suero. El volumen final de cada una de las soluciones de glu en presencia de GOD es de 1.0 mL. Par todos los casos: ET: W, Eref: $\text{Cu}^{\circ} | \text{Cu}(\text{II}) | |$



Se analizó una muestra de un voluntario con Dx de Insuficiencia Renal Crónica (IRC). Se tomó una muestra de sangre total (aproximadamente 6 mL) sin anticoagulante por medio de punción venosa. Una vez ocurrida la retracción del coágulo, la muestra se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Concluida la centrifugación, se separó el coágulo del suero. Para realizar la determinación de glu, se tomó un volumen de 200 μ L de suero y se le agregó 200 μ L de solución de GOD 50 mg/mL. La disolución se homogeneizó y se midió el potencial de la disolución de la muestra con los mismos E_i y E_{ref} usados en las curvas de calibración de la gráfica 20. El potencial medido de la muestra se evaluó en las ecuaciones de la curva de calibración, y considerando la dilución, se determinó la cantidad de glu en la muestra. En la tabla XIV se muestran los resultados obtenidos de la muestra analizada. En la tabla XIV se muestran también los valores de referencia para glu en suero (en mol/L), de dos fuentes bibliográficas diferentes. Es importante mencionar que la misma muestra se evaluó en las tres curvas de calibración, razón por la cual se presentes tres resultados.

Tabla XIV. Resultados de la determinación de glu en suero por potenciometría a corriente nula. Se muestran los resultados para una misma muestra, con tres curvas de calibración.

Muestra	E(mV)	Curva de calibración	C_{glu} (mmol/L)	Valores de referencia
1	276	1ª curva	19.2535	3.33 < mmol/L < 6.11 ^[49]
	276	2ª curva	94.6695	3.9 < mmol/L < 5.8 ^[50]
	276	3ª curva	1.1468	

Como se puede observar en los resultados de la tabla XIV, las concentraciones de glu determinadas en la muestra, con la metodología y la técnica propuestas, son inferiores en algunas ocasiones y superiores en otras, respecto a los valores de referencia reportados en la literatura. Es importante mencionar que estos valores de referencia están calculados en población estadounidense y en voluntarios sanos (recordar que la muestra proviene de un paciente con IRC). También es importante señalar que los valores de referencia aquí señalados corresponden tanto al mínimo como al máximo de los valores reportados para tres metodologías diferentes: uso de GOD con electrodo de oxígeno, uso de HK, y uso de GOD con monitoreo con indicadores coloridos.

2. Microconductimetría.

2.1 Construcción de equipo.

2.1.1 Microcelda conductimétrica.

Desde el punto de vista conceptual, la más sencilla de las técnicas electroanalíticas es la determinación de la conductancia electrolítica, la cual es proporcional a la concentración, no así su recíproco, la resistencia. Nótese que la conductancia es naturalmente no específica, de modo que una sola medición de la conductancia de una solución que tenga dos electrolitos, no puede proporcionar información individual de cualquiera de los dos componentes. Hoy en día, la conductimetría raras veces se emplea en la titulación, sin embargo, es un método muy valioso para observar la concentración en donde no se requiere la presencia de selectividad. La cantidad que se va a medir en la conductimetría es una propiedad del volumen total de la solución, y no esta basada en un fenómeno de interfase. ^[51]

Para la realización de mediciones de conductividad como monitoreo de una valoración, en condiciones de microescala, fue necesario construir una celda conductimétrica de dimensiones adecuadas para contener un volumen aproximado de 5.0 mL y el uso de una microbureta de 2.0mL. Se ensayaron dos variaciones de celda conductimétrica: la primera celda conductimétrica fue hecha con dos barras de C^o sujetas dentro una punta de pipeta automática ($10 < \mu\text{L} < 100$); la segunda celda constaba de dos barras de acero inoxidable colocadas hacia el fondo de la celda y soportadas por un trozo de goma para borrar. Es necesario recordar que el soporte de la celda es importante, debido que la distancia a la cual se encuentren ambos electrodos es determinante en la medición, o sea, ésta distancia no debe de variar a lo largo de la operación analítica.

2.1.2 Interfase conductimétrica.

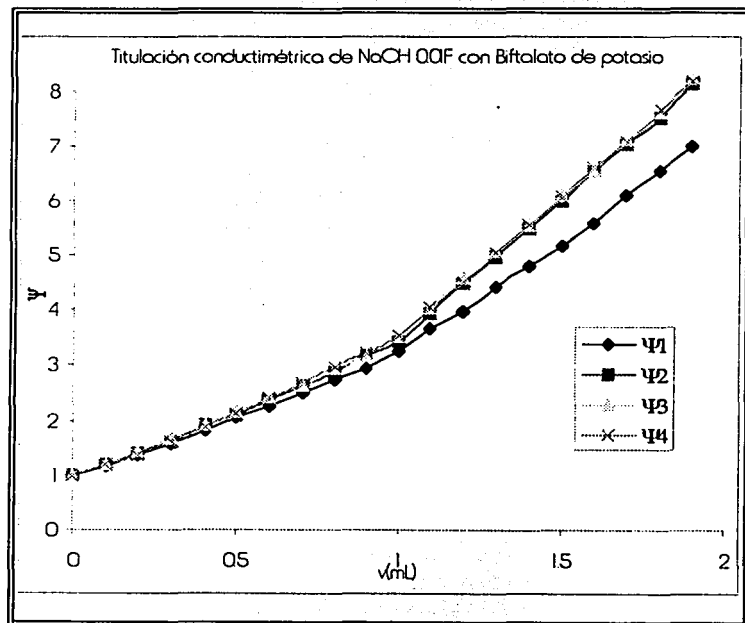
Para llevar a cabo la medición de la conductancia de las soluciones, se construyó una interfase conductimétrica mejorada en nuestro laboratorio, tomando como base la reportada por da Rocha ^[52] y cols. Se trata de un oscilador que genera una onda triangular en lugar de la onda sinusoidal clásica, la cual es aplicada a uno de los electrodos. El otro electrodo es acoplado a la salida de un convertidor corriente-potencial. Después de la rectificación y el paso por el filtro, la salida de potencial es proporcional a la conductancia. El potencial fue medido con un multímetro digital. En el anexo 2 se muestra tanto la interfase descrita.

2.2 Valoraciones conductimétricas.

2.2.1 Titulación de HCl con NaOH titulado.

2.2.1.1 Titulación de NaOH con monitoreo microconductimétrico.

Si bien la conductimetría es una técnica que no presenta una selectividad competente con otras técnicas electroanalíticas, si presenta una mayor sensibilidad. Para la realización de éste experimento se preparó una solución de NaOH 0.01F y una solución de Biftalato de potasio, patrón primario, tal que tuviese una concentración de 2.04 mg/mL. De este modo, un mililitro de la solución de Biftalato de potasio consumirá 1.0 mL de NaOH 0.01F. El monitoreo de ésta titulación se realizó microconductimétricamente, donde la celda conductimétrica fueron dos barras de carbono, acopladas a la interfase conductimétrica. En la gráfica 19 se presentan las curvas de titulación conductimétricas para los ensayos realizados. Nótese que se ha graficado $\psi=f(v)$, donde el parámetro adimensional ψ corresponde a $\psi = (E/E_0)$ y corregido previamente por la dilución de la muestra: $\Psi = \Psi^*[(v_0 + v_e)/v_0]$. Recordar que la conductimetría es una propiedad del volumen total de la solución, y no esta basada en un fenómeno de interfase. [51]



Gráfica 19. Se muestran las curvas de titulación de NaOH 0.01F con Biftalato de potasio 2.04 mg/mL y monitoreo microconductimétrico del Vp.f. Nótese que las curvas de titulación corresponden a una valoración conductimétrica típica de un ácido débil con una base fuerte, como lo es el sistema en estudio. La celda conductimétrica utilizada fueron dos barras de carbono

Para poder comparar los resultados obtenidos de la titulación de NaOH 0.01F con monitoreo microconductimétrico del Vp.f., se determinó la concentración exacta de la misma solución con monitoreo con indicador visual. Los resultados para ambos tipos de experimento se muestran en la tabla XIII.

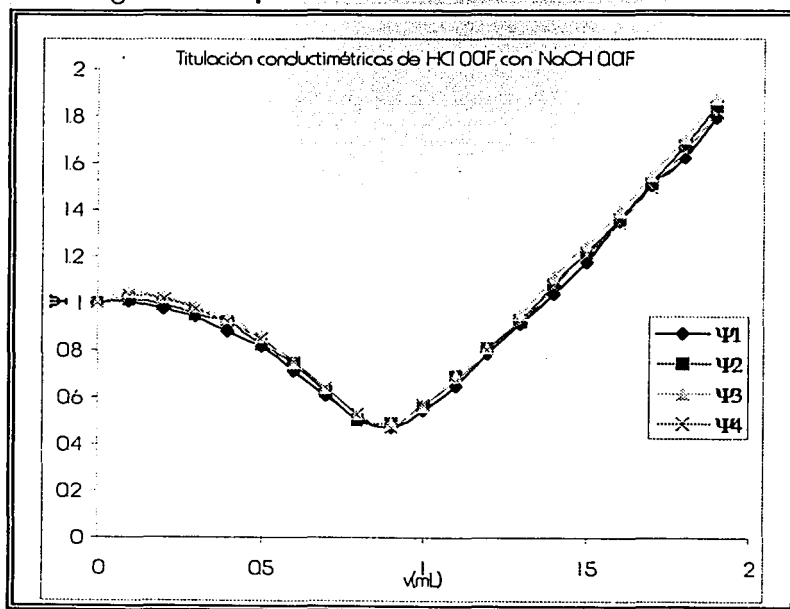
Tabla XIII Resultados de la determinación de la concentración NaOH 0.01F tanto con monitoreo conductimétrico, como con indicador visual del Vp.f.

Sistema de monitoreo	$C_{\text{NaOH } 0.01\text{F}}$ (mol/L)
Indicador visual (Fenolftaleina)	0.0095
Microconductimetría	0.0100

2.2.1.2 Titulación de HCl con NaOH titulado por monitoreo microconductimétrico.

La determinación de la concentración exacta de HCl se realizó con una valoración volumétrica y monitoreo conductimétrico, al igual que en el experimento del apartado anterior. En la gráfica 20 se presentan las curvas de valoración conductimétricas para los ensayos realizados. Nuevamente se ha graficado $\psi = f(v)$.

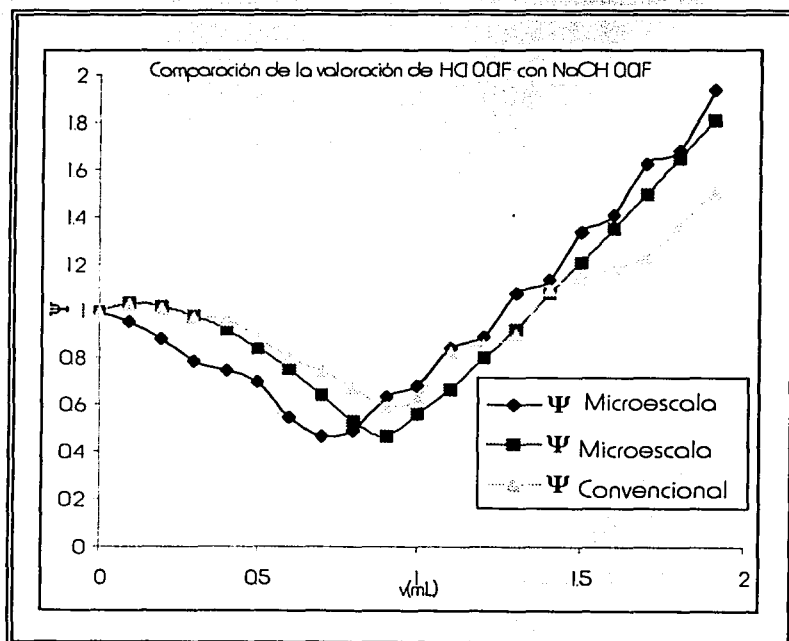
Gráfica 20. Se muestran las curvas de titulación de HCl 0.01F con NaOH 0.01F y con monitoreo microconductimétrico del Vp.f. Nótese que las curvas de titulación corresponden a una valoración conductimétrica típica de un ácido fuerte con una base fuerte, como lo es el sistema en estudio. La celda conductimétrica utilizada fueron dos barras de carbono



La concentración exacta de HCl 0.01F determinada por éste método fue de:

$$C_{\text{HCl}} = 0.0088 \text{ mol/L}$$

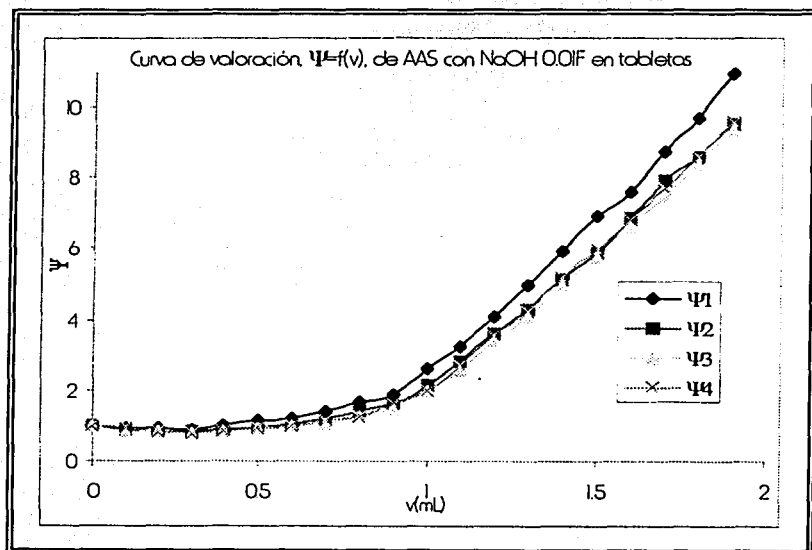
Para demostrar la correlación que existe entre el método instrumental propuesto en este trabajo con uno comercial, se realizó la misma titulación del HCl 0.01F tanto con el microconductímetro como con el conductímetro convencional. Sin embargo, la celda microconductimétrica de dos barras de carbono, fue sustituida por dos barras de acero inoxidable. En la gráfica 21 se muestran ambas curvas de titulación. También se ha graficado el parámetro ψ con fines de comparación, dado que los volúmenes utilizados en cada caso son hasta 10 veces mayores usando el instrumento convencional.



Gráfica 21. Comparación de la titulación de HCl 0.01F con NaOH 0.01F usando el microconductímetro con el conductímetro convencional. Nótese que son comparables. La celda conductimétrica utilizada fueron dos barras de acero inoxidable.

2.2.2 Determinación de AAS en tabletas por valoración volumétrica por monitoreo microconductimétrico

En el capítulo anterior, se propuso un método de valoración de AAS con monitoreo micropotenciométrico. En esta sección se propone un monitoreo microconductimétrico del Vp.f. Para ello, después de haber determinado el peso promedio de una muestra de tabletas comerciales de AAS, se preparó una solución de AAS a partir del contenido de la tableta, tal que un mililitro de ésta solución fuese neutralizado por NaOH 0.01F previamente normalizado. En la gráfica 22 se muestran las cuatro réplicas que se efectuaron de éste experimento. La celda microconductimétrica fue, en todos los casos, dos barras de acero inoxidable.



Gráfica 22. Curvas de valoración, $\psi=f(v)$, para la determinación de AAS en tabletas con NaOH 0.01F. La celda conductimétrica fueron dos barras de acero inoxidable.

El Vp.f. de cada una de las curvas de valoración de la gráfica 22 fue determinado de modo habitual para éste tipo de análisis instrumental. El porcentaje de AAS, referido al marbete, determinado por tableta fue de:

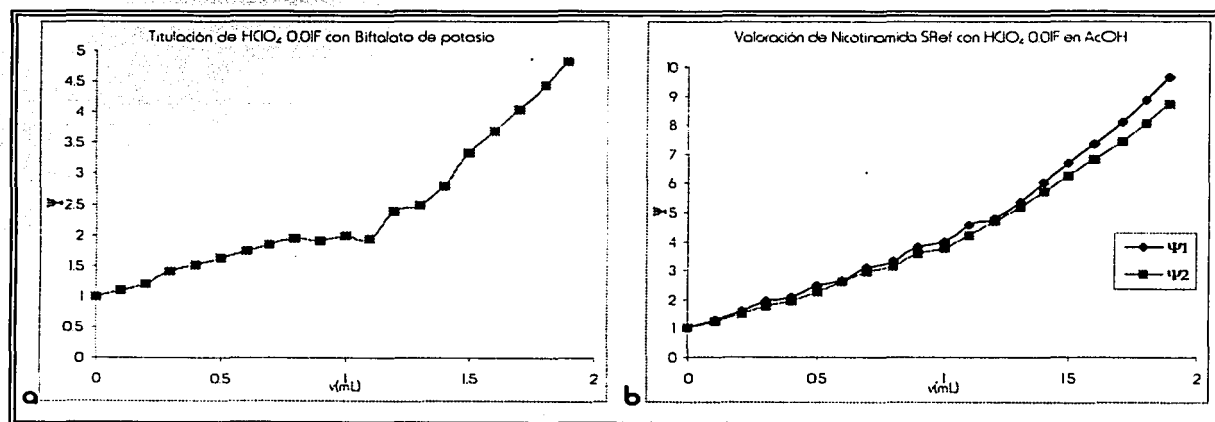
$$\%AAS = 96.8 \%$$

Además del porcentaje anterior, también se han calculado dos parámetros estadísticos básicos: la desviación estándar (S.D.) = 1.8312 y el % del coeficiente de variación (%C.V.) = 1.8917%.

2.2.3 Determinación de alcaloides totales (en forma de Nicotina) en cigarrillos por valoración microconductimétrica en medio no acuoso.

2.2.3.1 Valoración de Nicotinamida, SRef, como modelo de la determinación de alcaloides totales con monitoreo microconductimétrico. Titulación de HClO_4 0.01F con monitoreo microconductimétrico.

Como se menciona, ésta es una valoración en medio no acuoso, donde el medio de reacción es AcOH. En este disolvente, los alcaloides tienen propiedades ácido-base de carácter básico (son alcaloides), de modo que son susceptibles de ser valorados con un ácido conveniente. Al igual que el apartado 1.2.5, el titulante fue HClO_4 en AcOH. Como el HClO_4 es un patrón secundario, fue necesario estandarizarlo con un patrón primario: Biftalato de potasio. La normalización del HClO_4 0.01F se efectuó tanto con monitoreo microconductimétrico como con indicador visual, CV, del Vp.f. Una vez titulado el HClO_4 0.01F se utilizó para la valoración del alcaloide Nicotinamida SRef con monitoreo microconductimétrico del Vp.f. En la gráfica 23 se muestran la curva de titulación para el HClO_4 0.01F, así como las curvas de valoración de Nicotinamida SRef obtenidas por éste método.



Gráfica 23. a. Titulación de HClO_4 0.01F con Biftalato de potasio. Patrón primario y monitoreo microconductimétrico. **b.** Valoración de Nicotinamida, SRef, con HClO_4 0.01F normalizado y monitoreo microconductimétrico del Vp.f. En ambos casos, la celda conductimétrica fueron dos barras de acero inoxidable.

Se ha utilizado Nicotinamida como estándar externo en éste experimento, toda vez que es una base nitrogenada que reacciona de igual manera con el titulante HClO_4 0.01F en AcOH, o sea, tienen comportamientos semejantes durante la valoración. Con el uso de este estándar externo se probó la viabilidad del método.

En la tabla XIV se muestran los resultados obtenidos para la normalización del HClO_4 0.01F tanto con monitoreo microconductimétrico como con indicador visual CV.

Tabla XIV. Resultados obtenidos para la normalización del HClO_4 0.01F tanto con monitoreo microconductimétrico como con indicador visual CV.

Sistema de Monitoreo	C_{HClO_4} (mol/L)
Indicador visual: CV	0.0103
Microconductimetría	0.0086

En la gráfica 23 se observa que el modelo de alcaloide ensayado, Nicotinamida, presenta un resultado satisfactorio en la valoración de alcaloides en medio no acuoso con monitoreo microconductimétrico. Además del monitoreo microconductimétrico, también se realizó la valoración con indicador visual CV. En la tabla XV se muestran los resultados obtenidos para la valoración de Nicotinamida SRef.

Tabla XV. Resultados obtenidos para la valoración de Nicotinamida SRef, tanto con monitoreo microconductimétrico como con indicador visual CV.

Sistema de Monitoreo	Pureza _{Nicotinamida} (%)
Indicador visual: CV	103.7
Microconductimetría	112.8

Es necesario mencionar, que al igual que en los experimentos de potenciometría, para la determinación de analitos con patrones secundarios, se utilizarán como concentración exacta, aquella determinada con indicador visual.

2.2.3.2 Extracción de alcaloides totales a partir de tabaco.

El método de extracción de los alcaloides utilizado fue descrito por J.M. Hiller y colaboradores.^[53] En éste experimento se analizaron dos muestras comerciales diferentes. Una de ellas tiene la presentación a manera de cigarro (Puro), y la otra de cigarrillo. Para el análisis de los puros se utilizó una muestra de 3 de ellos; para la otra muestra se utilizaron 10 cigarrillos. A cada una de las muestras se determinó el peso promedio del contenido de tabaco. La extracción de los alcaloides se realizó de la siguiente forma: la muestra de análisis (300.0 mg de puro y 4.0900 g de cigarrillo) de tabaco se pulverizó y homogenizó en un mortero con pistilo, y se agitó en una solución de NaOH concentrado durante una hora aproximadamente. Posteriormente se filtró por gravedad la suspensión recolectando la fase líquida. Los residuos sólidos se desecharon. La fase líquida (acuosa) se colocó en agitación mecánica constante durante 7 horas con una solución de Tolueno:CHCl₃ (9:1.v/v). Concluido el tiempo de agitación, se dejaron las fases en contacto por un espacio aproximado de 36 horas. Se separó la fase orgánica, y la fase acuosa se desechó. Se permitió la evaporación del disolvente orgánico, auxiliado en ocasiones por un baño de María. Cuando el volumen de la fase orgánica hubo reducido aproximadamente tres cuartos del volumen original, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se desechó el botón consistente de residuos de pared celular. Se permitió nuevamente la evaporación del disolvente orgánico, hasta obtener finalmente los alcaloides.

2.2.3.3 Determinación de alcaloides totales (en forma de Nicotina) en cigarrillos por valoración microconductimétrica en medio no acuoso.

La Nicotina es el alcaloide predominante en el tabaco de los cigarrillos.^[54] por lo que puede ser utilizado como modelo para entender las reacciones químicas involucradas en el sistema en estudio. En agua, la Nicotina (C₁₀H₁₄N₂, P.M. 162.23) es una base débil bifuncional. La base libre es obtenida a partir de una suspensión de tabaco fuertemente alcalina, tal como se ha descrito en el apartado anterior. En AcOH, la Nicotina se comporta como una base fuerte, lo cual la hace susceptible de ser valorada por un ácido conveniente, como lo es el HClO₄ en AcOH. En la figura 7 se muestra la reacción solvatación de la Nicotina en AcOH.



donde:

B = Nicotina

BH^+AcO^- = Par iónico

AcO^- = Acetato

Figura 7. Reacción de solvatación de la Nicotina en AcOH.

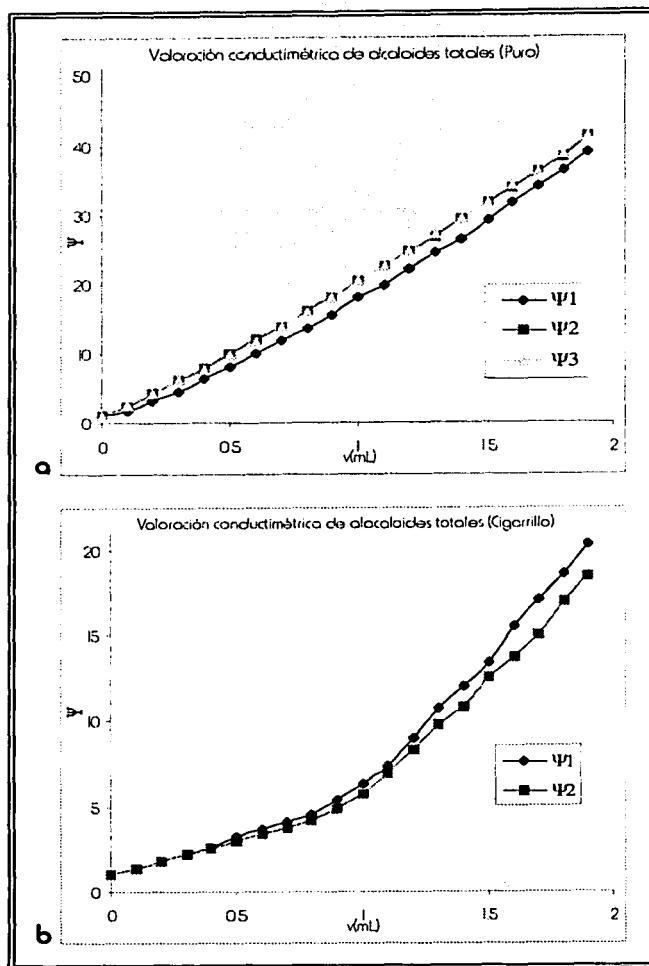
a) Muestra: *Puro*

Una vez que se obtuvieron los alcaloides, se disolvieron cuantitativamente en AcOH. En la gráfica 24a se muestran las valoraciones de una alícuota ($v=1.0$ mL) de esta solución con HClO_4 0.01F previamente normalizado y con monitoreo microconductimétrico del Vp.f. La celda conductimétrica fueron dos barras de acero inoxidable.

Muestra: *Cigarrillo*

Una vez que se obtuvieron los alcaloides, se disolvieron cuantitativamente en AcOH. En la gráfica 24b se muestran las valoraciones de una alícuota ($v=250$ μL) de esta solución con HClO_4 0.01F previamente normalizado y con monitoreo microconductimétrico del Vp.f. La celda conductimétrica fueron dos barras de acero inoxidable.

Gráfica 24. a. Curva de valoración conductimétrica, $\psi=f(v)$ para la determinación de alcaloides totales, en forma de Nicotina, con HClO_4 0.01F en la muestra del puro. Aunque la forma de la curva se observa atípica, fue posible calcular el Vp.f. de cada uno de los ensayos mostrados. **b.** Curva de valoración conductimétrica, $\psi=f(v)$ para la determinación de alcaloides totales, en forma de Nicotina, con HClO_4 0.01F en la muestra de cigarrillo. En ambos casos la celda conductimétrica fueron dos barras de acero inoxidable.



Con las gráficas obtenidas, se calculó el contenido de alcaloides totales en las muestras analizadas. En la literatura ^[55,56,57,58,59] se reporta un contenido de alcaloides totales, en forma de Nicotina en el intervalo de 0.6%<7.0 para una gran variedad de productos de tabaco. En la tabla XVI se muestra el contenido de alcaloides, referido a Nicotina, de las muestras utilizadas.

Tabla XVI. Resultados de la determinación de alcaloides totales en dos muestras de tabaco diferentes por valoración volumétrica con monitoreo microconductimétrico. Se observa que para la muestra de cigarrillo, se determinó un contenido exacto dentro de los reportados, no así para el puro, el cual coincide con lo esperado, o sea, un contenido marcadamente elevado de Nicotina.

Muestra	Contenido alcaloides (%)	Contenido reportado
Puros	10.6	0.6 < %7.0
Cigarrillos	1.6	

2.2.4 Control de la conductividad de agua para uso no potable.

En ésta sección, se determinó la conductividad de muestras de agua para diversos fines. La determinación de la conductividad se realizó con la celda conductimétrica dos barras de acero inoxidable, además de la interfase ya descrita.

2.2.4.1 Calibración de la celda conductimétrica.

Como ya se mencionó en la sección 2.1.2., el potencial de la solución, medido con la interfase conductimétrica descrita, es proporcional a la conductancia de la misma. Se sabe que una solución de KCl 0.01M tiene una conductividad igual a 1.305 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (microSiemens por centímetro) a 21°C [60].

Se preparó una solución de KCl 0.01F a la cual se determinó el potencial medido con un multímetro acoplado a la interfase conductimétrica construida en el laboratorio. El valor de potencial medido por éste medio fue de 2112mV, por lo que se puede decir que:

$$2112 \text{ mV} \approx 1.305 \text{ mS/cm}$$

2.2.4.2 Medición de la conductividad en muestras de agua.

Las muestras de agua analizadas fueron las siguientes:

- a) Agua desionizada del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.
- b) Agua inyectable marca Bristol, producto terminado.
- c) Agua inyectable marca Pisa, producto terminado
- d) Agua destilada. Laboratorio 3E/3F, Facultad de Química, UNAM. (Piseta)
- e) Agua destilada. Laboratorio 3E/3F, Facultad de Química, UNAM. (Contenedor)

En la tabla XVII se muestran los resultados de la determinación de la conductividad (κ) de las muestras ya mencionadas, así como el valor de potencial medido para cada una de ellas. Es importante mencionar que la medición del potencial se realizó durante cinco minutos, con una medición cada minuto, por lo que el valor reportado en la tabla XVII es un promedio de cinco determinaciones.

Tabla XVII Resultados de la determinación de conductividad en diversas muestras de agua con la interfase conductimétrica calibrada. En la última fila se presenta nuevamente la calibración de la interfase conductimétrica.

Muestra	E(mV)	κ ($\mu\text{S/cm}$)
Agua desionizada	544.4	336.4
Agua inyectable marca Bristol	110.4	68.2
Agua inyectable marca Pisa	57.8	35.7
Agua destilada (Piseta)	42.6	26.3
Agua destilada (Contenedor)	36.2	22.4
KCl 0.01M	2112	130.5

3. Microcromoamperometria y Micropolarografía. Voltamperometria ciclica.

3.1 Construcción de equipo.

3.1.1 Micropolarógrafo de Minima Instrumentación. (*Minimal Instrumentation Micropolarograph, M.I.M.P.*)

En 1990, J. Wang y colaboradores presentaron un compendio especial de la revista *Electroanalysis*.^[61] En éste número aparece un artículo donde Lafleur y cols. reportan el desarrollo de un polarógrafo de instrumentación sencilla susceptible de ser construido en condiciones de laboratorio. Sin embargo, éste modelo estaba limitado al uso de solo dos electrodos. En el año 2000, A. Baeza perfeccionó el polarógrafo de dos electrodos, logrando así el instrumento de tres electrodos básicos: E_r, E_{ref} y Electrodo auxiliar (E_{aux}). Una vez desarrollado el nuevo polarógrafo, que recibió el nombre de *Minimal Instrumentation Micropolarograph*, (M.I.M.P.), se comprobó su correlación con los instrumentos convencionales. En 2001, A. Baeza y F. J. Álvarez presentaron la construcción y los resultados de la correlación del M.I.M.P. con un polarógrafo convencional, un BAS CV-27.^[62] encontrando una sensibilidad para el nuevo instrumento en el intervalo de $10^{-3} < \text{mol/L} < 10^{-4}$. En el anexo 3 se muestra el M.I.M.P.

3.1.2 Microcelda electroquímica de tres electrodos.

Se diseñó y construyó una celda de capacidad aproximada de 5 mL que fuese redonda y de fondo plano, con cuatro entradas: para tres electrodos y la restante multifuncional (entrada de N₂, depósito las muestras, de patrones primarios, etc.). En el anexo 3 se muestra la microcelda electroquímica descrita.

3.1.3 Electrodo Goteante de Mercurio.

La polarografía, como un método electroquímico de análisis, así como el Electrodo Goteante de Mercurio (EGM) para el mismo fin fue desarrollado y descrito por primera vez por J. Heyrovský en 1924 donde indica que "El cátodo de goteo de mercurio se podrá utilizar como un método sistemático de análisis" ^[63] Por sus trabajos en el desarrollo de la polarografía, J. Heyrovský fue galardonado con el Premio Nobel de Química de 1959. ^[64]

El EGM consiste en un capilar de vidrio de 3 a 7 mm de diámetro externo y de 0.03 a 0.1 mm de diámetro interno. ^[65] Con ayuda de una manguera flexible de goma o de plástico, se une el capilar a un recipiente con Hg. Éste recipiente se coloca a una altura adecuada por encima del extremo libre del capilar de forma de obtener un goteo de Hg desde el capilar. Durante su uso, la solución a analizar, y en la cual el EGM está sumergido, no debe de ser agitada.

En este trabajo se utilizó un recipiente de Hg. conectado a un capilar de vidrio, el cual se colocó dentro de la microcelda electroquímica. Un recurso alternativo al capilar comercial para EGM es el uso de tubos capilares para termómetro, los cuales son susceptibles de control del diámetro de salida, tal que se obtenga un goteo de una gota/s, el ideal para polarografía con EGM.

El EGM presenta las siguientes características:

- a) Su área superficial es reproducible para un determinado capilar.
- b) La constante renovación de la superficie electrónica elimina los efectos de apasivamiento o envenenamiento.
- c) El sobrepotencial del hidrógeno sobre el electrodo hace que sea muy útil para especies electroactivas cuyo potencial de reducción sea considerablemente más negativo que el potencial reversible de la descarga del hidrógeno.
- d) El mercurio forma amalgamas con muchos metales, con lo cual disminuye el potencial de reducción de éstos.
- E) La corriente de difusión (i_{diff}) asume un valor uniforme en forma inmediata y es reproducible.

El EGM es útil en el intervalo de $0.3 < V < 2.8$ (vs SCE).

3.2 Cronoamperometría.

3.2.1. Determinación de Ácido Ascórbico en tabletas efervescentes.

3.2.1.1. Nociones básicas de cronoamperometría.^{66,67}

La cronoamperometría es una técnica en el cual el potencial del E_i es forzado a acoplarse a un programa de perturbación conocido. Este potencial se puede mantener constante o puede ser variado con el tiempo de una manera determinada, así, la corriente es medida en función del tiempo, de allí el nombre de *Cronoamperometría*. En éste técnica, el transporte de masa de las especies electroactivas solo ocurre por difusión, en otras palabras, es una técnica en Régimen de Difusión Pura (RDP), o sea, sin agitar. En la cronoamperometría, el área del electrodo (A) es suficientemente pequeña, y el volumen (V) de solución es suficientemente grande, así, el paso de la corriente no altera las concentraciones de las especies electroactivas en grandes proporciones. Tales condiciones de trabajo son conocidas como *Condiciones A/V*.

Es fácil demostrar que los resultados con electrodos de dimensiones del orden de algunos milímetros, operando en soluciones de 10 mL o más, no consumen fracciones significativas de especies electroactivas en solución, en aquellos experimentos con unos pocos segundos hasta unos cuantos minutos de duración. Hace algunas décadas, Laitinen y Kolthoff^{68,69} inventaron el término *Microelectrodo* para describir los procesos que ocurren al electrodo bajo pequeñas condiciones A/V.

En un inicio, el aporte de la corriente está dado por la corriente capacitiva, hasta el momento en que la corriente de difusión comienza a dominar y alcanza su valor máximo en lo que se conoce como la corriente límite de difusión, en donde todo lo que llega al electrodo es electrolizado, de ahí que en el patrón de respuesta de la curva, ésta se haga asintótica.

En las mediciones prácticas de $(i)_{\tau} = f(t)$, se tiene que ser precavido con el instrumental y las condiciones experimentales. Una de las condiciones experimentales de mayor importancia es el tiempo de muestreo (τ), que es tiempo al cual se harán las mediciones de corriente una vez que se ha iniciado el programa de perturbación. El τ adecuado para las mediciones de corriente dependen del arreglo experimental y se tiene que establecer en las condiciones de experimentación. Dentro de las mejores condiciones respecto al τ , se encuentran en el intervalo de 200 μ s y 200 s. *Limitaciones potencioestáticas:* La corriente máxima dependerá de la corriente y el potencial de salida características del potencioestato. *Limitaciones debidas a la convección:* A grandes τ el aumento de los gradientes de densidad y la existencia de desviaciones por las vibraciones, causarán la ruptura convectiva de la capa de difusión y usualmente resultará en corrientes mayores a las predecidas. En general, las mediciones para $\tau > 300$ s son difíciles, y aún mediciones de 20 s pueden mostrar efectos convectivos.

Finalmente, Cottrell reportó una explicación matemática de los procesos asociados a la cronoamperometría:

$$i_{dif}(t) = \frac{nFAD_i^{1/2}C_i}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Nótese que el efecto de la disminución de las especies electroactivas cercanas a la superficie del electrodo es caracterizado por una función inversa de $t^{1/2}$.

3.2.1.2: Propiedades generales del Ácido Ascórbico.

El Ácido Ascórbico (H_2Red), también llamado Vitamina C está relacionado con la enfermedad denominada Escorbuto.^[70] Ésta es una enfermedad muy antigua, referida por primera vez por los egipcios alrededor de 1500 a. C., y posteriormente fue claramente descrita durante las cruzadas, pero no es común en la actualidad. Desde el siglo XVI se sospechó que se trataba de una etiología nutricional, cuando en 1747 se observó que el padecimiento se podía evitar con la ingestión de cítricos.

El H₂Red fue aislado en 1932, y después recibió el nombre de ácido ascórbico, debido a sus propiedades *antiescorbúticas*. Las plantas y algunos animales pueden sintetizar H₂Red, no así los humanos, por lo que su ingesta es esencial. Como el H₂Red es lábil tanto al calor como al oxígeno, los alimentos frescos o sin cocinar son los que contienen las mayores cantidades de ésta vitamina. El H₂Red se absorbe en el intestino cercano; el exceso de H₂Red, así como su metabolito, el ácido oxálico, son excretados en la orina.

El H₂Red es importante en la formación y estabilización del colágeno, por medio de la hidroxilación de prolina y lisina, para el entrecruzamiento y la conversión de tirosina a catecolaminas. Si esto no ocurriese, se conduciría a la formación defectuosa de colágeno en las membranas basales capilares. Además, el H₂Red está involucrado en la síntesis de otras sustancias vasoactivas y neurotrópicas. Por otro lado, se ha evidenciado el papel del H₂Red en otras reacciones de hidroxilación, incluyendo la conversión de colesterol a ácidos biliares, el metabolismo de compuestos orgánicos extraños, y la síntesis de cartinina y esteroides,^[7] y protección contra la peroxidación de lípidos, o sea, el H₂Red es un agente reductor fisiológico. El H₂Red incrementa la absorción del hierro además de que está involucrado en la síntesis del grupo hemo.^[72,73] El metabolismo del ácido fólico, aminoácidos, nucleótidos cíclicos y de glu también involucran al H₂Red. También ha sido determinado un papel en la función inmune.

La fisiopatología del escorbuto puede describirse como una disminución de las pérdidas de las funciones del H₂Red. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia del H₂Red se presentan por múltiples síntomas, como son: fatiga, debilidad, letargia, irritabilidad, hemorragia gingival, dolor muscular, artralgias y pérdida de peso. Además se produce hiperqueratosis folicular típica con hemorragia perifolicular, debido a la formación deficiente del pelo. Las manifestaciones psicológicas son: depresión, histeria e hipocondrías. Todos los síntomas pueden ser evitados, ya sea consumiendo H₂Red procedente de la dieta, o en su defecto, como un suplemento alimenticio en dosis limitadas. Para este tipo de terapia, se ha desarrollado medicamentos, los cuales tienen en sus formulaciones H₂Red.

Por otro lado, el requerimiento de H₂Red se ve incrementado en enfermedades crónicas, durante el embarazo y durante el uso de anticonceptivos orales. La deficiencia de H₂Red ha sido observada en la población pediátrica que recibe leche de vaca sin suplementos así como en aquellos que reciben leche materna de madres que presentan la deficiencia de la vitamina.

Contrario a la creencia popular, el uso de H₂Red en la prevención de resfriados, y cáncer no ha sido científicamente probado, con la posible excepción del cáncer gástrico, debido a la prevención de la formación de nitrosamina.^[74] Aunque existe una ligera toxicidad del H₂Red, la ingesta excesiva puede interferir con el metabolismo de la Vitamina B₁₂ y con algunos fármacos.

Vitaminas como antioxidantes. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas generadas durante el metabolismo ordinario y a partir de ciertos fármacos o xenobióticos. La exposición a radiación ultravioleta, al humo del cigarro, y otros contaminantes ambientales incrementan la producción de radicales libres en el organismo. Éstos radicales libres de vida corta pueden dañar membranas, enzimas, y al mismo DNA. Existe todo un arreglo de defensas antioxidantes en las células y tejidos para prevenir la formación, o limitar los efectos de los radicales libres. Los radicales libres han estado implicados como una posible causa de cáncer y enfermedades cardiovasculares. La vitamina C y E, y el β -caroteno protegen contra el cáncer de pulmón, y otros tejidos epiteliales^[75] a través de diferentes mecanismos. Los retos clínicos indican una mejoría de las respuestas inmunes^[77] en la edad avanzada una vez que se llevan a cabo suplementos con Vitaminas C, E, y A o con β -caroteno. Recordar que el H₂Red es un agente reductor fisiológico.

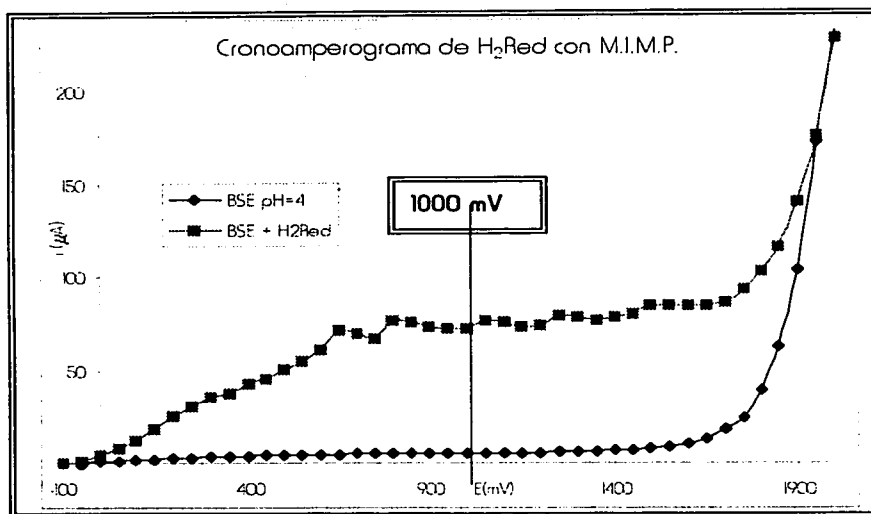
En éste trabajo se determinará el contenido de H₂Red en tabletas efervescentes, de contenido nominal de 1,0000 g. Se utilizará la técnica operatoria de cronoamperometría en RDP, ya que las propiedades redox del H₂Red así lo permiten.

El H₂Red es una vitamina de tipo hidrosoluble. La forma oxidada de la misma, recibe el nombre de dehidroascorbato. Por contener un grupo ene-diol, el H₂Red es un compuesto muy reductor, que presenta un $E^{\circ} = -0.058$ V. (vs. SCE) de acuerdo a lo reportado por S. Koltry y L. Šucha.^[77] Las propiedades redox del H₂Red están relacionadas con sus propiedades ácido-base, de acuerdo a la revisión realizada por Turyán y Kohen.^[78] El H₂Red tiene asociado dos valores de pK_a, los cuales son 4.00 y 11.27.^[79,80]

3.2.1.3 Establecimiento de los parámetros electroquímicos para la determinación de H₂Red en tabletas efervescentes.

Para conocer el comportamiento electroquímico del sistema en estudio, se utilizó una solución de H₂Red R.A. O.I.F en el medio de reacción o electrolito soporte, el cual fue una solución de KNO₃ 0.1F / Biftalato de Potasio 20 mM pH=4.0 (BSE). Se trazó el cronoamperograma del BSE. Posteriormente se le añadió 500 μ L de la solución de H₂Red 0.1F y se trazó el cronoamperograma en el mismo intervalo de potencial. En la gráfica 25 se muestran ambos cronoamperogramas. Las condiciones en que se trazaron los cronoamperogramas fueron:

- a) $-100 < mV < 2000$
- b) E_r: C° E_{ref}: Ag|AgCl E_{aux}: Acero inoxidable
- c) $\tau = 20$ s
- d) $\Delta E = 50$ mV
- e) RDP



Gráfica 25. Cronoamperograma, $i=f(E)$, para la determinación del potencial de trabajo al cual ocurre la oxidación del H₂Red. En la gráfica se presenta el cronoamperograma tanto del medio de reacción (BSE) como de la adición del analito (H₂Red). Además se ha destacado el potencial de trabajo, el cual fue el que se utilizó durante todo los experimentos de ésta sección. En ambos polarogramas: E_r:C° E_{ref}:Ag°|AgCl E_{aux}: Acero inoxidable y RDP

Para la determinación de H₂Red en la muestra, se utilizaron dos metodologías analíticas: las curvas de calibración y la segunda, la metodología de adiciones estándar.

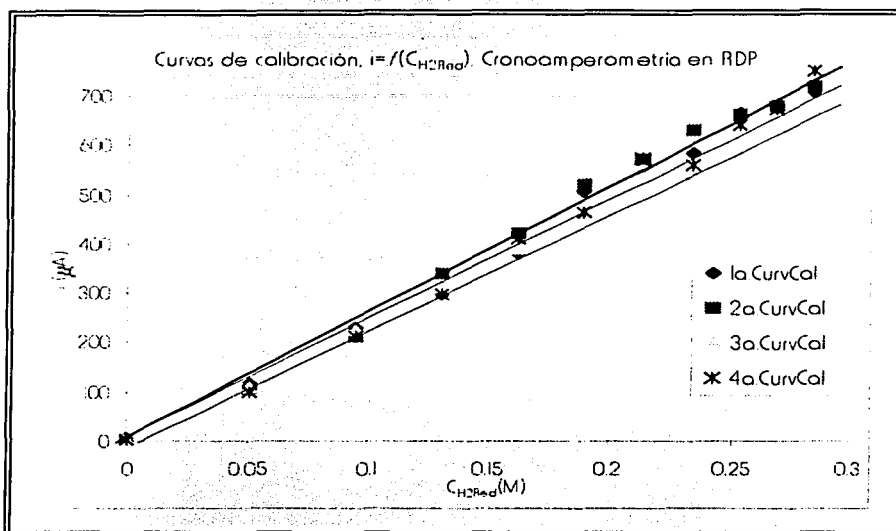
3.2.1.4 Determinación de H₂Red en tabletas efervescentes. Técnica operatoria: Cronoamperometría en RDP a E impuesto. Metodología analítica. Curvas de calibración $i=f(C_{H_2Red})$.

Como se mencionó en la sección, todos los experimentos que se presentan en esta sección y en la siguiente, se llevaron a cabo a un potencial impuesto de 1000 mV. El *tratamiento de la muestra* se presenta a continuación:

Se determinó el peso promedio de 5 tabletas efervescentes de H₂Red con un contenido nominal de 1000 mg H₂Red/tableta. Las tabletas se trituraron y homogeneizaron en un mortero. Para el análisis se tomaron masas del homogenizado de tableta.

Se realizaron cuatro *curvas de calibración* y tres análisis diferentes. Para realizar cada una de las curvas de calibración, se preparó una solución de H₂Red R.A. 1.0F que se mantuvo en hielo durante el tiempo en que se realizaba la curva de calibración. Se colocó en la celda electroquímica un volumen de 1.0 mL de BSE y se hicieron adiciones de 100 µL de la solución de H₂Red estándar. Después de cada adición se homogenizó el medio con microagitación mecánica durante unos segundos. Posteriormente se suspendió la agitación para medir la corriente a un potencial impuesto de 1000 mV y a un $\tau=20$ s. Para trazar la curva de calibración, se graficó la corriente medida en función de la concentración de H₂Red en la celda. En la gráfica 26 se muestran las cuatro curvas de calibración obtenidas, mientras que en la tabla XVIII se muestran las regresiones lineales para cada una de las curvas de calibración.

Para determinar la cantidad de H₂Red en la muestra, se colocó un volumen de 1.0 mL de BSE en la celda electroquímica y se agregó una masa de tableta, tal que contuviese el equivalente a aproximadamente 0.2 mmol del H₂Red. Se agitó la solución aproximadamente 3 minutos, para permitir que el analito se disolviera por completo. Se suspendió la agitación y se midió la corriente a un potencial impuesto de 1000 mV y a un $\tau=20$ s. El valor de corriente medido se interpola en la correspondiente curva de calibración para así conocer, posteriores cálculos, la cantidad de H₂Red en la muestra de análisis. Para todos los casos: E_r:C°, E_{ref}: Ag° | AgCl Eaux: Acero inoxidable.



Gráfica 26. Curvas de calibración, $i = f(C_{H_2Red})$ a $E = 1000$ mV y $\tau = 20$ s para la determinación de H_2Red en tabletas efervescentes. Er: C° Eref $Ag^\circ | AgCl$ Eaux: Acero inoxidable.

Tabla XVIII. Análisis de Regresión lineal para cada una de las curvas de calibración presentadas en la gráfica 26.

Curva de calibración	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación
1a curva de calibración	$y = 2573.6x - 11.0810$	0.9917
2a curva de calibración	$y = 2639.0x - 10.3960$	0.9932
3a curva de calibración	$y = 2382.5x + 0.3421$	0.9940
4a curva de calibración	$y = 2625.8x - 24.7470$	0.9920

Los resultados de la determinación de H_2Red en la muestra se presentan posteriormente en la tabla XX.

3.2.1.5 Determinación de H₂Red en tabletas efervescentes. Técnica operatoria: Cronoamperometría en RDP a E impuesto. Metodología analítica. Adiciones estándar.

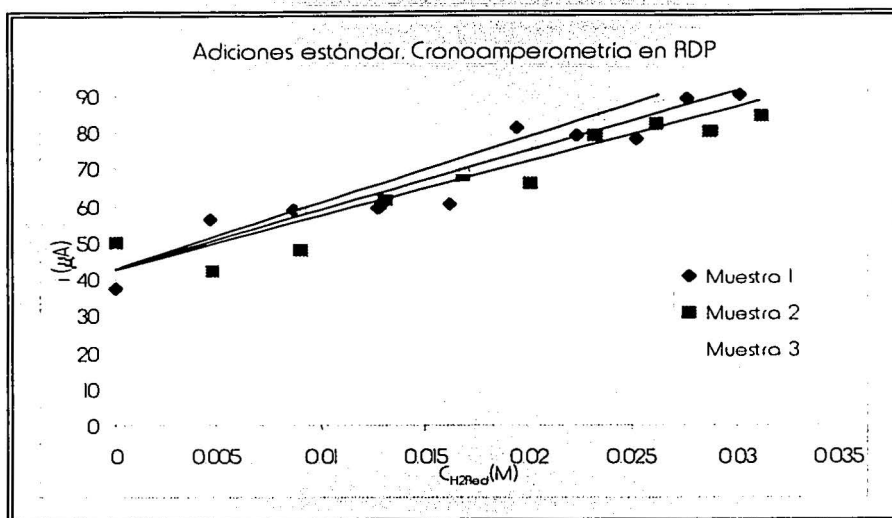
Para la determinación de H₂Red por medio de esta metodología analítica, se pesó una masa de tableta tal que fuese equivalente a 0.02 mmol de H₂Red y se disolvió en 2.0 mL de BSE. Se agitó la solución aproximadamente 2 minutos \pm 1, para permitir que el analito se disolviera por completo. Se suspendió la agitación y se midió la corriente a un potencial impuesto de 1000 mV y a un $\tau=20$ s. Cuando se tuvo la medida de la corriente, se hicieron adiciones de 100 μ L de solución estándar de H₂Red O.I.F. Después de cada adición se homogeneizó la muestra con microagitación mecánica. Posteriormente se suspendió la agitación y se midió la corriente a 1000 mV y a un $\tau=20$ s.

Para determinar la cantidad de H₂Red en la muestra, se realizaron las gráficas los datos de corriente medida en las condiciones ya mencionadas en función de la concentración añadida de H₂Red. Se determinó la ecuación de regresión lineal y con ésta última, cálculos posteriores, se determinó el contenido de H₂Red en la muestra. Se realizaron 3 réplicas del análisis. En la gráfica 27 se muestran los resultados obtenidos para esta metodología analítica; en la tabla XIX se muestran las regresiones lineales para cada uno de los ensayos realizados. Para todos los casos: E_i: C^o E_{ref}: Ag^o | AgCl E_{aux}: Acero inoxidable.

El marbete de la muestra analizada es el siguiente:

Cada tableta contiene:

Ácido ascórbico	1.0 g
Excipiente c.b.p.	1 tableta



Gráfica 27. Adiciones estándar, $i = f(C_{\text{H}_2\text{Red}})$ a $E=1000$ mV y $\tau=20$ s para la determinación de H_2Red en tabletas efervescentes. $E_r: \text{C}^\circ$ $E_{\text{ref}} \text{Ag}^\circ | \text{AgCl}$ $E_{\text{aux}}: \text{Acero inoxidable}$.

Tabla XIX. Análisis de Regresión Lineal para la determinación de H_2Red en tabletas por adiciones estándar.

Nº de ensayo	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación
1er ensayo	$y = 1604.2x + 42.0830$	0.9101
2do ensayo	$y = 1395.0x + 42.0290$	0.8978
3er ensayo	$y = 1725.4x + 41.9140$	0.9473

Los resultados de la determinación de H_2Red en la muestra se presentan posteriormente en la tabla XX.

Tabla XX. Resultados de la determinación de H₂Red en tabletas efervescentes. Se presentan los resultados de ambas metodologías analíticas utilizadas.

Metodología analítica	No. de ensayo	m _{mtra} (mg)	Contenido de H ₂ Red (%)
Curva de calibración	1	355.8	142.5
		352.8	144.5
		354.8	142.1
	2	355.8	138.8
		352.8	138.5
		354.8	138.4
	3	355.8	151.4
		352.8	153.7
		354.8	151.0
	4	355.8	142.3
		352.8	144.4
		354.8	132.2
Adiciones estándar	1	30.8	316.1
	2	30.4	367.8
	3	32.3	279.1

En la tabla XX se puede observar que las determinaciones realizadas de H₂Red en la muestra presentan un contenido mayor al referido al marbete. Sin embargo, hay que recordar que las formulaciones que contienen H₂Red como principio activo, tienen un exceso de hasta un 20% del nominal debido a la cinética rápida de descomposición del H₂Red. En particular para la metodología de *curva de calibración*, se observa que el ensayo número 2 es que presenta una mayor precisión en la medición. Por otro lado, para la metodología de *adiciones estándar*, presenta una menor exactitud, tal vez por efecto de matriz.

3.2.2 Determinación de agua en medios orgánicos anhidros por el método de Karl-Fischer.

3.2.2.1 Métodos para la determinación del contenido de agua.

El conocer el contenido de humedad que contiene una muestra para análisis es usualmente requerido, además de que el conocer la cantidad de agua presente en una sustancia es imperativo para establecer un proceso de fabricación (síntesis orgánica) o prever la estabilidad de una forma farmacéutica o producto alimenticio. El agua contenida en las muestras puede estar presente ya sea como diluyente, o como impureza. En las muestras sólidas el agua puede ser clasificada como *libre* o *unida*. El agua libre esta referida a la humedad absorbida en la superficie del sólido, y el agua unida esta referida al agua de cristalización, así, el agua libre es considerada una impureza. La *determinación de agua* en una muestra no debe de ser confundida con el *análisis de agua*. La determinación de agua, también es llamada, algunas veces, Acuametría. ^[81]

Los métodos de determinación de agua pueden ser físicos o fisicoquímicos. Cada uno de los métodos existentes, son adaptados a las diferentes muestras, según la naturaleza de la misma. Los métodos de determinación de agua, más empleados se describen a continuación ^[82-83]:

Pérdida por secado.

Este es quizá el método de determinación de humedad más simple. Se realiza en un horno cuya temperatura está en el intervalo de $100 < ^\circ\text{C} < 125^\circ$ a la presión atmosférica. La muestra pesada y dispuesta en un crisol a peso constante se coloca dentro del horno durante cierto tiempo. Al final de este "tiempo de secado" se determina la masa nuevamente se pesa y se vuelve a colocar en la estufa, generalmente por una hora. Se realiza una nueva determinación de la masa de la muestra, la cual no debe diferir de la precedente. El objetivo es llegar a un peso constante (diferencia $<$ o igual a 0.5 mg / g de muestra total). La pérdida de peso de la muestra es atribuida a pérdida de agua. La FEUM establece como peso constante cuando se obtengan dos pesadas sucesivas que no varíen en más de 0.0005 g , después de un periodo de desecación o calcinación.

Para llevar a cabo este método es necesario tener muestras de análisis del orden de 1.0 g como mínimo. El método no es aplicable a compuestos volátiles o compuestos cuyo punto de ebullición es muy bajo, ni de tipo termolábil.

Destilación azeotrópica.

Muchas parejas de líquidos no pueden ser separados en compuestos puros mediante destilación ya que se forman mezclas de punto de ebullición idéntico y constante. Esta mezcla de punto de ebullición idéntico recibe el nombre de azeótropo. En ebullición, el agua forma con ciertos disolventes orgánicos (benceno, tolueno, xileno) azeótropos que son destilables. Esta separación en forma de vapores permite la transferencia de agua a un tubo graduado. La lectura sobre éste último establece la cantidad de agua contenida en la muestra. En la FEUM, el disolvente que se utiliza es el tolueno, aunque varias normas internacionales utilizan el xileno. El agua y el tolueno forman un azeótropo cuyo punto de ebullición es de 84.1°C; el azeótropo contiene 19.6% de agua. Como esta mezcla es prácticamente inmiscible, el producto de la destilación se separa en dos fases.

Para tener una precisión suficiente es indispensable obtener un volumen de agua mayor a 0.5 mL, por lo que las muestras son de una masa alrededor de 5.0 g, pesadas con precisión. La destilación se efectúa hasta que el volumen de agua sea constante.

Termobalanza.

El instrumento comprende una balanza y un desecador de rayos infrarrojos. La muestra sólida se coloca en un recipiente adecuado sobre el plato de la balanza. Se efectúa la tara y el calentamiento de la muestra se realiza con rayos infrarrojos. La pérdida de peso se controla por registros continuos hasta que se alcanza un peso constante. Diversas mejoras electrónicas permiten controlar la temperatura y la razón de cambio de la misma. La precisión requerida de la balanza debe ser del orden de 0.01 g.

Coulombimetría.

Esta es una técnica reciente que mide la cantidad de corriente que se utiliza para oxidar *in situ* yoduro a yodo, que reacciona con agua presente. La celda de valoración comprende dos compartimentos, uno para el ánodo y el otro para el cátodo, separados por un sinterizado de cerámica. La muestra se coloca en el compartimiento anódico. Un exceso de yodo en el ánodo indica el fin de la valoración. Este método permite la determinación de cantidades de agua del orden de ppm.

Cromatografía de gases

La determinación cuantitativa de agua por cromatografía de gases se realiza a condición de usar un detector que ofrezca una respuesta al paso del vapor de agua. El detector de conductividad térmica permite esta detección. La muestra es tratada con dimetilsulfóxido y se usa una fase estacionaria del tipo de Porapak Q. Esta técnica se aplica a muestras demasiado volátiles o que sean susceptibles de reaccionar con la solución de Karl Fischer (ver más adelante).

Resonancia Magnética Nuclear^[84]

Esta técnica se aplica principalmente en el estudio de la humedad residual de productos biológicos liofilizados desde 1965. Es rápida, sensible, no destruye la muestra y no depende de la solubilidad de la misma.

3.2.2.2 Determinación de agua por reacción de Karl Fischer.

Otro método para la determinación de agua se basa en la reacción de Karl Fischer. En 1935 Karl Fischer describió un método volumétrico (yodométrico) específico para la determinación de agua.^[85] Este método emplea el reactivo conocido como Solución de Karl Fischer (KFS) descrito en el apartado 3.2.2.3. Los primeros instrumentos que permitieron la determinación de agua con ayuda de la KFS aparecieron hacia 1950. Ahora, existen equipos de valoración automática regulados por microprocesadores. La determinación de agua por este método es descrito en la FEUM^[86] para diversos análisis. La técnica también es descrita por normas internacionales y otras para materias primas más específicas. La muestra sometida a este análisis puede estar con o sin tratamiento previo. Para el laboratorio de control de calidad, es indispensable un instrumento de valoración automática que utilice el método de Karl Fischer para determinar bajas concentraciones de agua.

La titulación por el método de Karl Fischer usualmente cuantifica tanto el agua unida como el agua libre. El analito puede ser cuantificado en presencia de ácidos inorgánicos, alcoholes, fenoles, éteres, hidrocarburos, anhídridos, amidas, haluros orgánicos, sulfuros y una variedad de sustancias. Sin embargo, las sustancias que reaccionan con yodo pueden interferir en la determinación, tal es el caso de tioles y el H_2Red , así como los compuestos carbonílicos. Los ácidos carboxílicos son capaces de llevar a cabo esterificaciones con metanol, obteniéndose como producto de la reacción la formación de agua. Las cetonas, aldehidos, mercaptanos, aminas, peróxidos y silanoles reaccionan con la KFS. Por otra parte, algunos iones pueden alterar las reacciones de oxidoreducción del par yodo/yoduro, como son el NO_2^- , $Sn(II)$, $Fe(III)$, SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$. El exceso de KFS promueve las reacciones de condensación, obviamente, por el gran poder desecante de la solución. El intervalo de concentraciones de analito detectable es amplio, la dosificación es rápida, automatizable y la reproducibilidad excelente.

3.2.2.3 Solución de Karl Fischer.

La KFS es una mezcla de I_2 , SO_2 y piridina (Pyr) en metanol (MeOH). La Pyr incrementa la estabilidad de la KFS por la formación de complejos de transferencia de carga con el yodo y el SO_2 y así reduciendo la presión de vapor de estas sustancias volátiles. De acuerdo a cálculos estequiométricos, la composición del KFS, en términos de molaridad (mol/L), debe ser: $I_2 : SO_2 : MeOH : 3Pyr$. Sin embargo, pueden ocurrir numerosas reacciones colaterales entre estas sustancias, por lo que hay una disminución de cada uno de los reactivos. La KFS usualmente es preparada como una solución de yodo, SO_2 y Pyr en MeOH, cuyas concentraciones molares aproximadas son: $I_2 : 3SO_2 : 10Pyr$. La "fuerza" efectiva del reactivo, esta limitada, entonces, por el contenido de yodo. La "fuerza" observada siempre es menor que la teórica, debido a las reacciones colaterales mencionadas anteriormente. La KFS preparada recién preparada presenta una "fuerza" aproximada del 80% de la teórica, la cual cae rápidamente alrededor del 50% en un mes y hasta el 40% en tres meses. La "fuerza" típica que se observa en la KFS está dentro del intervalo de $3 < mgH_2O/mL KFS < 6$. De ahí que es necesario estandarizar la KFS al inicio de cada jornada de trabajo. Es de suma importancia hacer notar que la llamada "fuerza de la solución" no es otra cosa más que el *título* de la misma.

La KFS es estandarizada titulando cantidades conocidas de agua. El agua líquida es un patrón satisfactorio, sin embargo su peso molecular tan pequeño es una desventaja para esta operación. Las sales hidratadas han sido propuestas como patrones de titulación de la KFS. Un reactivo que se proponga como un patrón adecuado para obtener el título de la KFS debe de cumplir con los siguientes criterios: ^[87]

a) Debe ser comercialmente accesible en un grado de pureza R.A. y debe de contener la cantidad de agua teórica.

b) Debe de liberar cuantitativamente la cantidad de agua contenida para reaccionar con la KFS, y no debe de presentar reacciones secundarias con alguno de los componentes de la KFS.

c) Debe de ser estable y no higroscópico en condiciones normales de almacenamiento.

d) La cantidad de agua contenida debe de ser determinada exactamente por un método de análisis independiente.

El Tartrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{Tart} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) parece ser un patrón primario satisfactorio. ^[88] La única desventaja que presenta es su insolubilidad en MeOH ; por lo que la titulación de la KFS debe llevarse a cabo lentamente, pero suficiente para asegurar que toda el agua contenida ha sido liberada. La KFS "gastada" (es decir, la solución que ha reaccionado totalmente con agua) es de color amarillo canario.

Finalmente, la KFS se debe de conservar en frascos de color ámbar, protegidos de la luz, sellados herméticamente y a una temperatura en el intervalo de $4^\circ\text{C} < 8$ para disminuir la cinética de descomposición del reactivo.

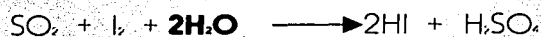
3.2.2.4 Técnicas para el monitoreo del punto final de la reacción de valoración

Al parecer, la reacción de la KFS con agua ocurre en dos pasos:



La primera reacción ocurre solo cuando esta presente la base que se ha elegido, para éste caso, dicha base es Pyr.

La primera reacción es reversible, y la Pyr desplaza el equilibrio hacia la derecha cuantitativamente debido a la combinación de la misma con el HI producido. El yodo es capaz de oxidar al SO_2 para formar HI y H_2SO_4 , según la siguiente reacción:



Esta es la reacción que necesita agua para que se lleve a cabo. Ya se mencionó la reacción que se lleva a cabo cuando hay Pyr presente.

La observación del punto final de la valoración se puede hacer con varias técnicas, las cuales se describen a continuación:

Autoindicación visual

Como ya se mencionó, la KFS en presencia de agua es de color amarillo canario, por lo que antes del punto final de la valoración, la solución es amarilla, y solo después de que se ha llegado al punto final, el primer exceso de KFS imparte a la solución el característico color rojizo del yodo a la solución. A pesar de que la técnica no permite observar un punto final de la valoración muy claro, la técnica es completamente reproducible.

Espectrofotometría

La titulación de Karl Fischer puede ser llevada a cabo determinando la absorbancia de la solución a 525 nm, longitud de onda a la cual la KFS sin utilizar absorbe la luz, no así la solución "gastada". Esta técnica provee una gran sensibilidad y precisión.

Técnicas electroquímicas

Una indicación electrométrica, de tipo amperométrica, es la más utilizada alrededor del mundo, y se prefiere sobre las técnicas antes mencionadas. Toda vez que el par redox yodo/yoduro permite el flujo de corriente, se hace oxidar el yoduro en el ánodo, mientras que el yodo se reduce en el cátodo. Mientras no haya yodo en la solución, no hay flujo de corriente, sin embargo, al primer exceso de yodo hay un aumento en la misma, lo que indica el final de la valoración. Este es un método de rutina en muchos laboratorios de análisis. Se utilizan dos electrodos de platino, al tiempo que se aplica un potencial a través de los mismos, hasta que un galvanómetro registra el cambio en la corriente. Esta forma de titulación electrométrica ha sido llamado de "punto muerto", y no se llevan a cabo mediciones de "punto por punto" rutinariamente. Nótese que este método no es más que una titulación amperométrica cruda.

En esta sección, se han ensayo otras técnicas electroquímicas de monitoreo del punto final de la valoración, como son el potenciométrico a corriente nula y el conductimétrico, ambos en condiciones de microescalamiento. Sin embargo, se ha realizado un monitoreo amperométrico "punto por punto" utilizando el M.I.M.P.

3.2.2.5 Construcción de equipo para valoración Karl Fischer.

Como ya se mencionó anteriormente, existen instrumentos comerciales de valoración que utilizan la reacción de Karl Fischer, pero tienen la desventaja de ser muy caros. Para la realización de este trabajo se diseñó una celda de valoración en condiciones de microescalamiento, semejante a la presentada en el anexo 3. Dicha celda tiene cuatro aberturas disponibles que se utilizan en la colocación de los electrodos, la entrada de la KFS y otra utilizada para la colocación de la muestra. A cada una de las aberturas se le acondicionó de modo que se mantuviera hermética para evitar la entrada de humedad del ambiente hacia el interior de la misma. Esta celda se presenta en el anexo 4. La dosificación de la KFS se realizó desde la microbureta que se estuvo utilizando en los experimentos de volumetría anteriores, modificada: la llave de tres vías fue removida, debido a que el material de fabricación de la pieza es susceptible a daño por la KFS; para regular el volumen de KFS se utilizó un conector tipo caimán, el cual oprime a la manguera por donde es dosificado el titulante. El sistema de microagitación no sufrió cambio alguno. En cada una de las técnicas electroquímicas de monitoreo del punto final de la valoración ensayadas se utilizaron electrodos los cuales se detallan en la sección correspondiente. La celda para

3.2.2.6 Reacción de Karl Fischer. Monitoreo micropotenciométrico ($i=0$)

Hasta el día de hoy, no ha sido reportado una técnica de monitoreo del punto final de la valoración Karl Fischer de tipo potenciométrico a corriente nula. Para realizar este trabajo, la micropotenciometría a corriente nula fue la primera técnica en ensayarse para esta valoración. Se utilizaron varios electrodos, por lo que en cada ejemplo que se exponga se detallará el electrodo y la función del mismo. Se utilizó KFS comercial (J.T. Baker), la cual fue titulada con $\text{Na}_2\text{Tart} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ R.A. en MeOH. Para obtener el MeOH anhidro, se le adicionó KFS c.p.b. neutralizar el agua contenida, evidenciado por la persistencia del color rojo característico del yodo en la KFS.

En primer lugar se realizó la neutralización del agua con KFS contenida en el MeOH utilizado y monitoreo potenciométrico. Una vez neutralizada, se agregó a la solución $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pesado con exactitud, y se prosiguió con la valoración, ahora del agua procedente del patrón primario. En la gráfica 28 se muestra esta titulación "en continuo" de la KFS. Los electrodos utilizados fueron de carbono, tanto el E_i como el E_{ref} . El potencial se midió, nuevamente, con un multimetro digital. Se ha graficado $pe = f(v)$.

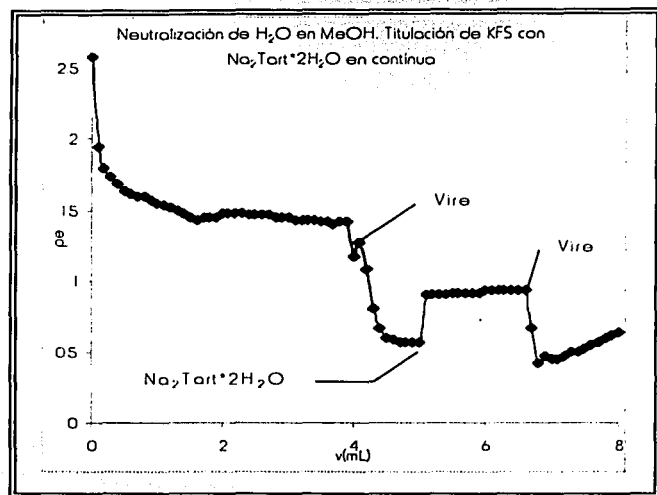
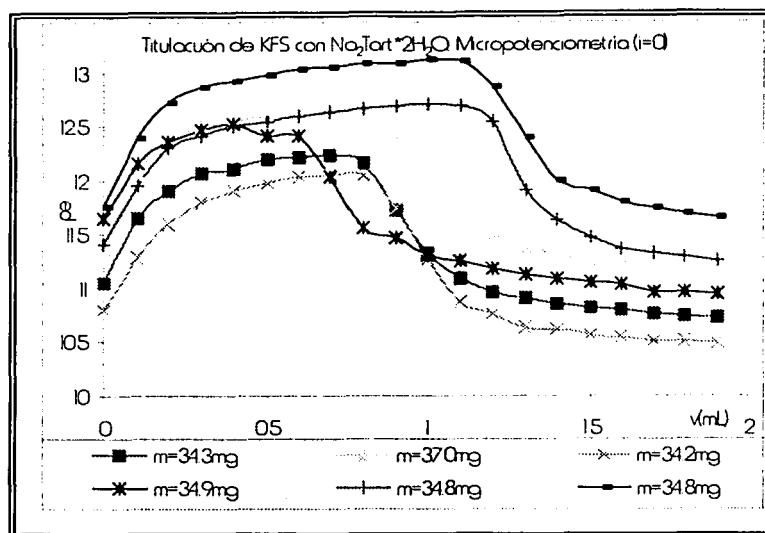


Gráfico 28. Neutralización del agua contenida en el MeOH y posterior titulación de la KFS con $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En la gráfica se ha destacado los puntos de viraje de la solución y el punto donde se adicionó el patrón primario. Se observa una caída de pe posterior al primer exceso de KFS. Ambos electrodos son de carbono.

Como se puede observar en la gráfica 28, los electrodos utilizados son de carbono, sin embargo se observó un pasivamiento del mismo cuando se hacían réplicas del experimento, por lo que se decidió cambiar los electrodos. En la gráfica 29 se muestran los resultados para la titulación de KFS con $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y monitoreo micropotenciométrico a corriente nula. Los electrodos utilizados son: E_i : Pt; E_{ref} : $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{AgNO}_3$ en $\text{MeOH}||$. Nuevamente se ha graficado $pe = f(v)$. Es importante mencionar que previo a la titulación de la KFS, se neutralizó el agua contenida en MeOH con KFS en exceso.

Gráfica 29. Titulación, $p_e=f(v)$, de KFS con $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y monitoreo micropotenciométrico del Vp.f. La variación de los volúmenes se debe a la variación de la masa de patrón primario para cada ensayo. Para todos los casos: E:Pt; Eref: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{AgNO}_3$ en MeOH || Eaux: Acero inoxidable



De los resultados de la gráfica 29 se determinó el Vp.f. por el método de la primera derivada y posteriormente obtener el título de la KFS. En la tabla XXI se muestran los resultados para la determinación del título de la KFS con la técnica de potenciometría a corriente nula.

Tabla XXI. Resultados de la determinación del título de KFS con patrón primario $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y monitoreo micropotenciométrico del punto final.

$m_{\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}}$ (mg)	Vp.f. (mL)	Título KFS (mg H_2O / mL KFS)
34.3	0.8542	6.2899
37.0	0.9375	6.1821
34.2	0.9792	5.4709
34.9	0.7083	7.7182
34.8	1.2826	4.2524
34.8	1.2609	4.3256

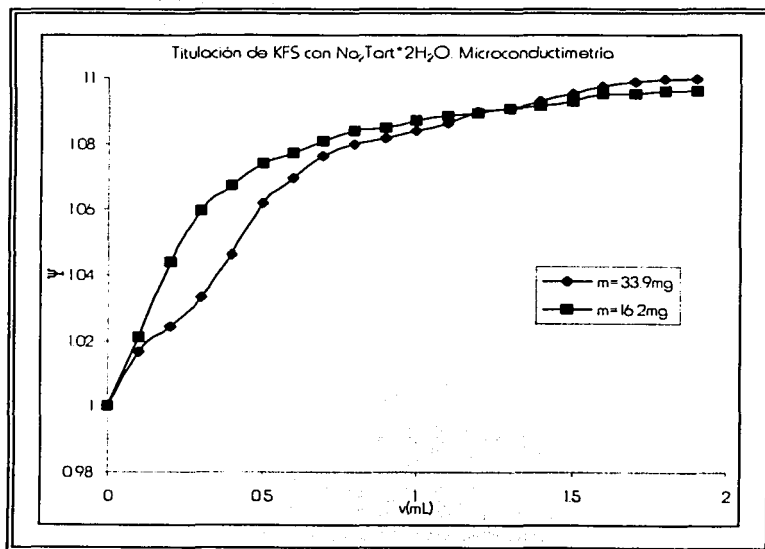
Para este experimento, se determinó un título de la KFS igual a:

Título KFS = 5.7065 mg H₂O / mL KFS

Además del promedio anterior, también se han calculado dos parámetros estadísticos básicos: S.D. = 1.3184 y %C.V. = 23.1026%.

3.2.2.7 Reacción de Karl Fischer. Monitoreo microconductimétrico

Al igual que en el apartado anterior, hasta el día de hoy no se reportado un monitoreo del Vp.f. de la valoración de Karl Fischer con una técnica conductimétrica. Para la realización de éste trabajo, se ensayó la microconductimetría como una segunda técnica de monitoreo de la reacción de valoración estudiada. Para ello, se utilizó la celda conductimétrica descrita en el apartado 2.1.1, así como la interfase para conductimetría descrita en el apartado 2.1.2, sin embargo, las barras de carbón de la celda fueron sustituidos por dos barras de acero inoxidable. En la gráfica 30 se muestran los resultados obtenidos para la titulación de la KFS con Na₂Tart*2H₂O como patrón primario. En este caso, el disolvente utilizado siguió siendo MeOH, al cual se le neutralizó la cantidad de agua contenida con KFS en exceso, previo a la titulación de la KFS.



Gráfica 30. Curvas de titulación, $\psi = f(v)$, de KFS con Na₂Tart*2H₂O y monitoreo microconductimétrico. La diferencia en el Vp.f. se debe a la diferencia de las masas de patrón primario. En ambos casos los electrodos de la celda son de acero inoxidable

En la tabla XXII se muestran los resultados de la titulación de la KFS con el monitoreo microconductimétrico del Vp.f. correspondientes a la gráfica 30

Tabla XXII. Resultados de la determinación del título de KFS con patrón primario $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y monitoreo microconductimétrico del punto final.

$m_{\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}}$ (mg)	Vp.f. (mL)	Título KFS ($\text{mgH}_2\text{O} / \text{mL KFS}$)
33.9	0.6813	7.7941
16.2	0.3556	7.1361

Para este experimento, se determinó un título de la KFS igual a:

$$\text{Título KFS} = 7.4651 \text{ mg H}_2\text{O} / \text{mL KFS}$$

Es importante hacer notar que el título de la KFS difiere del monitoreo micropotenciométrico, sin embargo, el objetivo de éste trabajo es mostrar que la técnica sirve. Posteriores trabajos del tipo de validación brindaran un soporte estadístico riguroso sobre la veracidad y correlación de las técnicas oficiales y las aquí propuestas.

3.2.2.8 Reacción de Karl Fischer. Monitoreo microamperométrico

Como ya se mencionó en el apartado 3.2.2.4, las técnicas más empleadas en el monitoreo de la valoración con KFS, son las electrométricas, ya sean amperométricas o potenciométricas. En este trabajo, se presenta una cronoamperometría como una técnica operatoria en condiciones de microescalamiento para el monitoreo de la reacción de valoración con KFS. En el apartado referido, también se menciona que se utilizó nuevamente el M.I.M.P. como instrumento generador de los patrones de perturbación necesarios para realizar la cronoamperometría a potencial impuesto. En la gráfica 31 se presentan los resultados de valor absoluto de corriente, $|i|$, para determinar los parámetros adecuados para el monitoreo del sistema en estudio, como son el E de trabajo a imponer, y el τ adecuados. Es necesario tomar en cuenta que todas las determinaciones realizadas se realizaron con agitación, o sea, en un Régimen de Difusión Convectivo (RDC).

Los parámetros utilizados en la gráfica 31 son:

Para todos los casos:

- a) $-500 < mV < 500$
- b) $E_r: Pt - E_{ref}: Ag^+ | AgCl - E_{aux}: C^{\circ}$
- c) $\tau = 20 \text{ s}$
- d) $\Delta E = 50 \text{ mV}$
- e) RDC

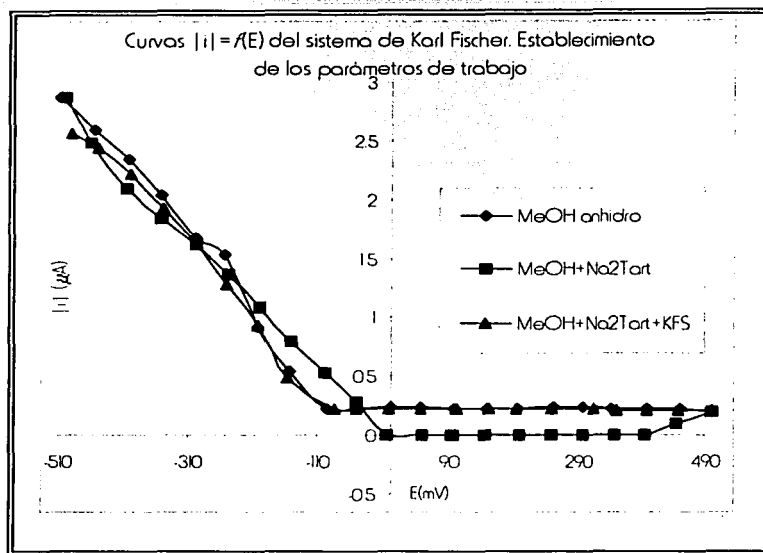
En la gráfica 31 se muestran las siguientes variantes de experimentación:

MeOH anhidro: Se colocó MeOH y se adicionó KFS c.b.p. neutralizar el agua contenida del disolvente, indicado por la persistencia del color impartido por el yodo. Con los parámetros antes mencionados se trazó la curva $i = f(E)$ mostrado en la gráfica 31

MeOH + Na₂Tart: Al MeOH anhidro anterior, se le agregó una masa de Na₂Tart*2H₂O. La solución se agito hasta la liberación de las moléculas de agua del patrón primario, indicado por el color amarillo de la solución. Se trazó la curva $i = f(E)$ mostrada en la gráfica 31 para esta nueva solución. Se observa que a $E > 0 \text{ mV}$, la i medida es menor que cuando no hay agua presente en el medio.

MeOH + Na₂Tart + KFS: Una vez concluido el trazo de la curva $i = f(E)$, a la solución anterior se le agregó KFS en exceso para neutralizar el agua contenida en el patrón primario. Una vez alcanzada la neutralización, se trazó la curva $i = f(E)$ mostrada en la gráfica 31 para esta nueva solución.

Gráfica 31. Curvas $|i| = f(E)$ para la determinación de los parámetros de trabajo adecuados de monitoreo de la reacción con KFS. En los tres casos: Er: Pt, Eref: Ag|AgCl Eaux: C° y RDC



De los resultados obtenidos en la gráfica 31 se establece que la reacción de valoración con KFS el E de trabajo adecuado es de 250 mV, E donde es posible determinar la presencia de agua en el medio sin reaccionar, como lo indica la segunda variante del experimento de la gráfica.

Posteriormente, se calculó el título de la KFS con $\text{Na}_2\text{Tart} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y monitoreo cronoamperométrico a $E=250$ mV en RDC. Los resultados para determinación del título de la KFS se muestran en la gráfica 32. La variación en el Vp.f. es debido a la variación en las masas de patrón primario utilizado.

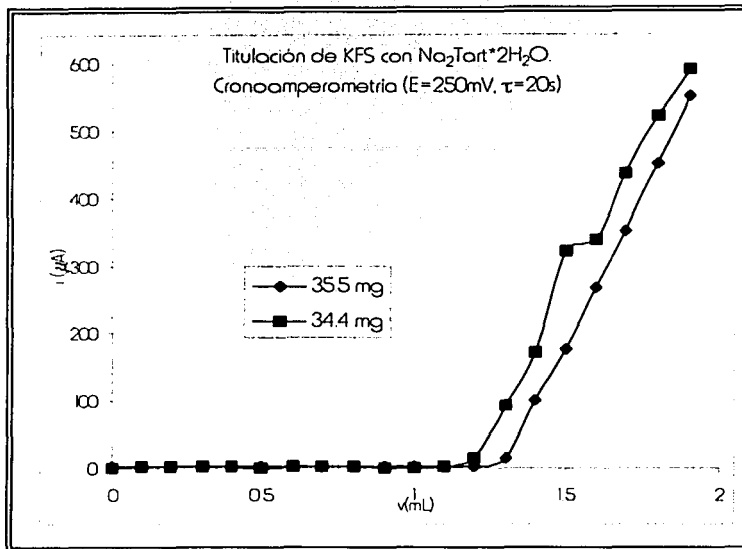


Gráfico32.

Cronoamperometría, $i=f(v)$ para la determinación del título de la KFS de tipo "punto por punto". La variación en el Vp.f. se debe a la variación de la masa de patrón primario utilizada. En ambos casos: $E_r: \text{Pt} \text{ Eref: } \text{Ag}^\circ | \text{AgCl} \text{ Eaux: } \text{C}^\circ \text{ y RDC.}$

Los resultados de la determinación del título de la KFS se muestran en la tabla XXIII.

Tabla XXIII. Resultados de la determinación del título de KFS con patrón primario $\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y monitoreo microcronoamperométrico del punto final

$m_{\text{Na}_2\text{Tart}\cdot 2\text{H}_2\text{O}}$ (mg)	Vp.f. (mL)	Título KFS ($\text{mgH}_2\text{O} / \text{mL KFS}$)
35.5	1.2817	4.3386
34.4	1.1935	4.5148

Para este experimento, se determinó un título de la KFS igual a:

Título KFS = 4.4267 $\text{mg H}_2\text{O} / \text{mL KFS}$

3.2.2.9 Determinación de agua en Acetonitrilo por el método de Karl Fischer con monitoreo microamperométrico

El título de ésta sección (Determinación de agua en medios orgánicos anhidros por el método del Karl-Fischer) anticipa este ensayo. El acetonitrilo, CH_3CN , (AN), es un medio de reacción aprótico utilizado tanto en síntesis orgánica como en análisis químico. De acuerdo a Popovich y Tomkins ^[89], el AN es un disolvente bipolar aprótico de constante dieléctrica intermedia, $\epsilon=36.0$, de baja basicidad y muy poco ácido. La partícula ácida de éste disolvente, el ión CH_3CNH^+ es estable en disolución, sin embargo, la partícula básica, el ión CH_2CN^- , parece ser inestable ya que tiende a formar especies poliméricas. Debido a la inestabilidad de la base conjugada del AN y del AN mismo, la reacción de autodisociación respectiva aun no ha sido determinada con exactitud. En el AN, las impurezas más comunes son el CO_2 , el agua así como los productos de hidrólisis del disolvente como la acetamida, el acetato e amonio, el amoniaco y el AcOH . El AN es obtenido comercialmente como un co-producto de la manufactura del acrilonitrilo. También se puede preparar por deshidratación de acetamida o de acetileno y amoniaco. El AN tiene un aroma parecido al éter; es altamente venenoso, irrita la piel y arde con una llama luminosa. Es miscible con agua, MeOH , Acetato de metilo, soluciones de acetamida, CHCl_3 , CCl_4 , cloruro de etileno y muchos hidrocarburos saturados (fracciones de la destilación del petróleo). Se usa como una materia prima de la síntesis orgánica de acetofenona, ácido α -naftalenacético, tiamina y acetamidina. También se usa para remover resinas residuales de la destilación del petróleo, así como fenoles, y sustancias coloridas a partir de hidrocarburos. El AN es utilizado en la extracción de ácidos grasos a partir del aceite de hígado de pescado y otros aceites vegetales y animales. Puede ser usado para recristalizar esteroides.

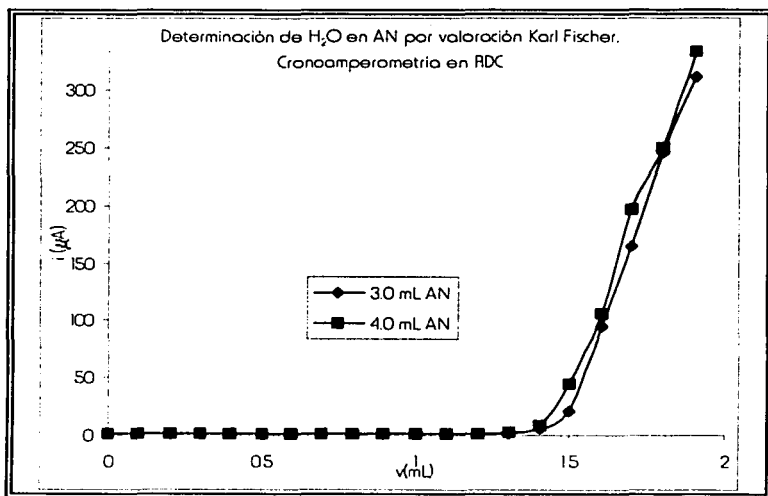
En el campo de la investigación, se usa como un medio inerte en estudios fisicoquímicos, y como un medio en que se involucren las reacciones de ionización. Es utilizado como un medio de reacción en titulaciones en medios no acuosos, y como un disolvente no acuoso de algunas sales inorgánicas, como son el AgNO_3 , LiNO_3 , y el MgBr_2 .^[90] Además es uno de los medios predilectos cuando se realiza química orgánica mecanística en medios no acuosos^[91], o sea, debe de ser un medio anhidro, para lo cual es necesario conocer la cantidad de agua presente en el disolvente. Para conocer esta cantidad de agua contenida, se propone la utilización de la reacción de Karl Fischer. Se utilizó como muestra AN anhidro puro (J.T. Baker) el cual está destinado para estudios mecanísticos orgánicos en medios no acuosos. De todas la técnicas propuestas en las secciones anteriores, se utilizará la cronoamperometría en RDC, debido a que es la técnica que mas se asemeja a las utilizadas oficialmente, lo que se traduce como una alternativa viable a las labores docentes y de campo de la utilización de este sistema químico de determinación de agua.

Como norma general, ya se explicaba en la sección 3.2.2.3, la KFS fue estandarizada cada nueva jornada de trabajo. Para conocer la cantidad adecuada de muestra de análisis se realizaron varios ensayos de monitoreo del contenido de agua en el AN. Los volúmenes de muestra utilizados fueron 3.0 mL y 4.0 mL. En la gráfica 33 se muestran los resultados de la determinación de agua en AN puro. Las condiciones de trabajo se presentan a continuación:

- a) $E = 250 \text{ mV}$
- b) $E_r: \text{Pt} \quad E_{\text{ref}}: \text{Ag}^\circ | \text{AgCl} \quad E_{\text{aux}}: \text{C}^\circ$
- c) $\tau = 20 \text{ s}$
- e) RDC

Gráfica 33.

Cronoamperometría para la valoración "punto por punto" de agua en AN puro, por valoración Karl Fischer. Se presenta el resultado para la valoración en dos muestras de análisis. En ambos casos: $E_r: \text{Pt}$
 $E_{\text{ref}}: \text{Ag}^\circ | \text{AgCl}$ $E_{\text{aux}}: \text{C}^\circ$



En la tabla XXIV se muestran los resultados de la determinación de agua en AN puro. Es necesario establecer que hace falta llevar a cabo más réplicas del experimento realizado para poder tener un resultado más exacto del contenido de agua en la muestra, y por supuesto, elaborar un protocolo de validación del nuevo método de determinación de agua en condiciones de microescalamiento con el fin de correlacionar los datos obtenidos con los procedimientos oficiales.

Tabla XXIV. Resultados de la determinación del contenido de agua en AN por valoración Karl Fischer. Se muestra también el título de la KFS determinado y utilizado para este experimento.

Titulo KFS (mg H ₂ O / mL KFS)	v AN (mL)	Vp.f. (mL)	Contenido de agua (mg H ₂ O / mL AN)
6.3366	3.0	1.4805	3.1271
	4.0	1.4464	2.2913

De los resultados de la tabla XXIV, se calculó el contenido de agua en la muestra de AN:

Contenido de agua en AN = 2.7092 mg H₂O / mL AN

A pesar de que solo se presentan dos resultados para una misma determinación se llevó a cabo el tratamiento estadístico básico: S.D. = 0.5910; %C.V. = 21.8146%.

3.2.3 Determinación de glu en suero con electrodo de pasta de carbono/GOD.

3.2.3.1 Construcción del electrodo de trabajo: GOD/Carbono/Nujol

Desde siempre se ha sabido de las propiedades conductoras del carbono. En años recientes, se crearon los electrodos de pasta de carbono (CP), llamados habitualmente composites los cuales están formados por polvo de carbono grafito mezclados con el elemento selectivo de análisis, en un medio oleoso e inerte, como lo es el aceite mineral o Nujol.

Recientemente, J. Wang y cols.^[92] han reportado el desarrollo de estos electrodos de CP usando esferas de carbón vitreo en lugar de carbono grafito. Para la realización de este trabajo se diseñó y construyó un composite de CP grafito con la enzima GOD, o sea, un *biocomposite*, en aceite mineral (Sigma-Aldrich), en las proporciones 50:50 (p/p).

3.2.3.2 Determinación de glu en suero. Técnica operatoria: cronoamperometría en RDP a E impuesto. Metodología analítica. Curva de calibración $i=f(C_{glu})_E$

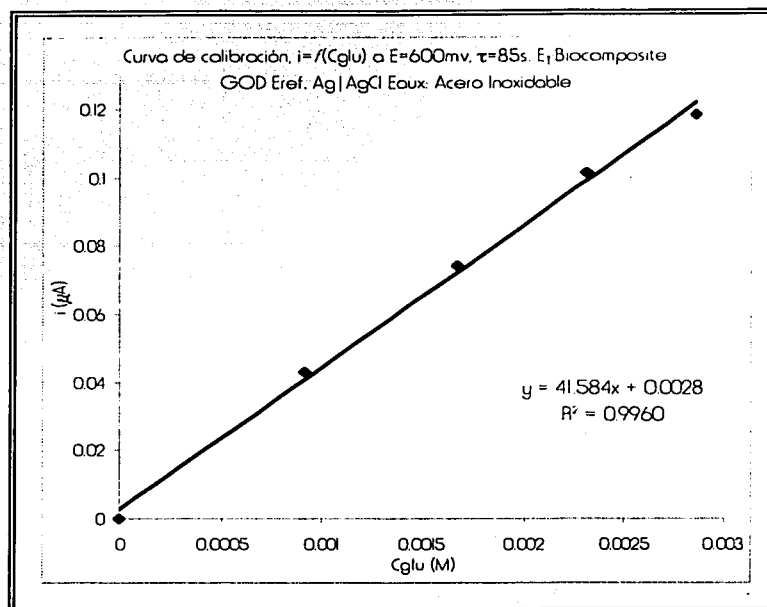
Una vez obtenido el *biocomposite* mencionado anteriormente, se realizó una cronoamperometría con el mismo como E_r , en una solución a la cual se le fue añadiendo cantidades conocidas de glu SRef en solución, de modo que al final se pudiese obtener una curva de calibración de tipo $i=f(C_{glu})_E$. Las condiciones en que se realizó la cronoamperometría fueron las siguientes:

- a) $E = 600$ mV
- b) E_r : *Biocomposite* GOD/PC/Nujol E_{ref} : $Ag^{\circ} | AgCl$ E_{aux} : Acero inoxidable
- c) RDP

Es importante mencionar que la cronoamperometría NO se realizó con el M.I.M.P. como en los casos anteriores, sino con el Software llamado VoltaMaster, versión X 9523-2.3, y con un potencióstato/galvanostato comercial marca Radiometer Copenhagen modelo PGP 20I. El registro cronopotenciométrico típico de este experimento se presenta en la gráfica 34. Se observó que a cada aumento de la concentración de glu en la celda, correspondía un aumento en la i a valor de E dado a un mismo τ ; dicho E es igual a 600 mV (E de oxidación del H_2O_2) aun $\tau = 85$ s. Bajo estas nuevas condiciones se construyó la curva de calibración, $i = f(C_{glu})_{E=600mV, \tau=85s}$, para el analito en cuestión. En la gráfica 34 se muestra la curva de calibración obtenida bajo las siguientes condiciones:

- a) $E = 600$ mV
- b) E_r : *Biocomposite* GOD/PC/Nujol E_{ref} : $Ag^{\circ} | AgCl$ E_{aux} : Acero inoxidable
- c) $\tau = 85$ s
- d) RDP

Gráfica 34. Curva de calibración $i = f(C_{glu})$ para la determinación de glu en suero. La lectura de i al E impuesto es registrada por el software utilizado. En el gráfico se presenta la ecuación de la recta que describe la curva de calibración, así como el valor del coeficiente de correlación.



Con la curva de calibración que se presenta en la gráfica 35, se determinó el contenido de glu en dos muestras de suero de pacientes que cursan con IRC. Una de los pacientes cuya muestra fue analizada, además del problema renal, cursa con DMNID. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas, se presentan en la tabla XXV. Es importante mencionar que tanto los valores de i de la curva de calibración, como los de los obtenidos para las muestras (ver tabla XXV) fueron corregidos por el efecto de la dilución, y así son presentados en este trabajo.

Tabla XXV. Resultados de la determinación de glu en suero con biocomposite de CP/GOD en dos muestras. Nótese la diferencia de resultados entre la muestra del paciente con DMNIN y la muestra que no presenta un segundo Dx.

Muestra	Dx 1	Dx 2	$i_{E=600mV}(\mu A)$	$C_{glu} (mM)$	Valores de referencia (mM)
1	IRC	—	0.769	36.8	3.9 < mM < 5.8 ^[93]
2	IRC	DMNID	0.877	42.04	

En los resultados presentados en la tabla XXV se observa que los valores de glu determinados para cada una de las muestras no están dentro del intervalo de los valores de referencia. Sin embargo, hay que recordar que estos valores de referencia están descritos para una población estadounidense y determinados por un método espectrofotométrico de análisis. Un estudio más riguroso de la alternativa planteada en este trabajo, consistiría en repetir el análisis con muestras control, hacer estudios comparativos tanto en pacientes como en voluntarios sanos, la validación tanto del sistema como del método, y posteriormente, la determinación de los valores de referencia para la determinación de glu en suero con un *biocomposite*. A pesar de todo, es importante resaltar que el *biocomposite* es lo suficientemente sensible para distinguir la diferencia más importante en el Dx de DMNID, que es el aumento de los valores de glu respecto a un individuo no diabético.

3.3 Polarografía.

3.3.1. Determinación de Ácido Nalidixico en tabletas.

3.3.1.1 Nociones básicas de polarografía.^{166,67)}

Como ya se mencionó en la sección 3.1.3, fue el *professor* J. Heyrovský de la Universidad de Praga, el iniciador de la polarografía analítica. La primera medición realizada con un polarógrafo, en 1922, fue a cargo de J. Heyrovský cuando interpretó correctamente el incremento de la i en el intervalo de $-1.9 < V < -2.0$ debido a la deposición de iones Na^+ formando una amalgama para una solución de NaOH 1M. De estos comienzos, las mediciones de las corrientes polarográficas se extendieron a estudios fundamentales y teóricos de los procesos al electrodo, acompañado de reacciones y del análisis químico. Heyrovský fue, pues, la influencia más poderosa del desarrollo de la ciencia electroanalítica en el siglo XX.

Como se habrá podido notar en la sección 3.1.3, el EGM es bastante incómodo, pero sus inconvenientes están compensados por varias de las ventajas que ofrece, como son:

a) A causa de la frecuente renovación dada por el goteo del electrodo, la concentración de cualquiera de los metales reducidos disueltos en el mercurio nunca podrá alcanzar niveles significativos.

b) La contaminación en la superficie del electrodo no se podrá acumular más de lo que dura cada gota. Estos dos factores hacen posible mediciones de alta precisión.

c) El EGM no es permanentemente modificado por reacciones al electrodo, por depósitos de material en o sobre el mismo.

d) El EGM muestra un elevado sobrevoltaje con respecto a la reducción del agua a hidrógeno, lo cual hace a la polarografía accesible a la medición de muchos iones metálicos con potenciales de reducción en el intervalo que llega hasta aproximadamente -2.0V (vs SCE) que nunca podrían ser determinados con un electrodo de Pt.

e) La técnica es conveniente para mediciones cuantitativas porque los platos de i son obtenidos en la región límite de transferencia de masa de cada onda.

El análisis polarográfico cuantitativo está basado en la unión lineal entre la i de difusión y la concentración en el seno de la disolución de las especies electroactivas, como lo demuestra la ecuación de Ilkovic:

$$i_{dif} = 607 n D_i^{1/2} C_i m^{2/3} t^{1/6}$$

donde:

m = velocidad de flujo de masa del mercurio

t = tiempo de goteo del mercurio (en s)

Los restantes parámetros presentes en la ecuación ya han sido descritos en la sección de *abreviaturas*.

Cada gota se elimina mecánicamente en el mismo momento en que aumenta el E, de manera que la gota se mantiene en un E constante, durante el t que dure. La polarografía es un método en RDC, por la convección producida por la gota al caer.

El método polarográfico de análisis está basado en las curvas corriente-potencial, o curvas I-E, llamadas *Polarogramas*, que se originan en un Microelectrodo, cuando la etapa determinante de la velocidad de una reacción electroquímica es la difusión. El desarrollo de la polarografía, se inició cuando J. Heyrovský introdujo el elemento de selectividad a través de un control de potencial del electrodo, elemento que estaba ausente.

La polarografía se aplica en la identificación cualitativa de una sustancia problema, toda vez que numerosos grupos funcionales orgánicos producen ondas polarográficas, sin embargo, la principal aplicación de la polarografía se encuentra en el análisis cuantitativo. Puesto que la magnitud de la i_{cat} es proporcional a la concentración del analito, la altura de la onda polarográfica es proporcional a la cantidad de analito presente. Se pueden usar metodologías analíticas, tales como: curvas de calibración, adiciones estándar o estándar interno.

3.3.1.2 Propiedades generales del Ácido Nalidixico. ⁽⁹⁴⁾

Desde hace años, se ha contado con algunos de los miembros originales de fármacos antimicrobianos sintéticos de la clase las quinolonas, y en particular, el Ácido Nalidixico (ANX) para tratar infecciones de vías urinarias; los productos de esta categoría tienen importancia relativamente pequeña por su limitada utilidad terapéutica y la rápida aparición de resistencia bacteriana. Todos los derivados disponibles contienen una fracción de ácido carboxílico en la posición 3 de la estructura fundamental. Su mecanismo de acción es a nivel de DNA. Los fármacos, como el ANX inhiben el superenrollamiento del DNA mediado por la DNA girasa de bacterias a concentraciones que guardan relación neta con aquellas necesarias para inhibir la proliferación bacteriana. Mutaciones en el gen que codifica para el polipéptido de la subunidad A de la enzima confiere resistencia al fármaco. El ANX es un bactericida que actúa sobre casi todas las bacterias gramnegativas comunes que causan infecciones en vías urinarias, pero su actividad intrínseca es limitada; *P. aeruginosa* es resistente al ANX. En general, las quinolonas se absorben adecuadamente después de ingerirlas y se distribuyen de manera amplia en los tejidos corporales. Los alimentos no aminoran su absorción después de ingerir el fármaco, pero pueden prolongar el lapso hasta que se alcancen sus concentraciones máximas en plasma. El volumen de distribución de las quinolonas es grande, y las concentraciones observadas en orina, pulmón, riñón próstata, heces, bilis y macrófagos son mayores que las observadas en suero. Las cifras en LCR y prostático son menores que las presentes en plasma. El ANX es eliminado por vías extrarrenales, por lo que no se necesitan dosis de ajuste en pacientes que cursan con IRC. Las quinolonas suelen ser bien toleradas. Las reacciones secundarias más comunes incluyen cefalea, náuseas, dolor abdominal y vértigos. En niños que han consumido ANX se ha descrito artralgias e hinchazón articular; por tal razón, es mejor no utilizarlo en pre-púberes o en mujeres embarazadas. El ANX es útil solamente en infecciones causadas por bacterias sensibles.

3.3.1.3 Establecimiento de los parámetros electroquímicos para la determinación de ANX en tabletas

El ANX es un antibiótico electroactivo, por lo cual puede ser cuantificado por algún método electroquímico. En el presente trabajo se realizó la determinación de ANX en tabletas, producto terminado, por polarografía clásica, usando el EGM y el M.I.M.P., como alternativa a al método de valoración oficial (de materia prima) el cual trata de una valoración volumétrica en medio no acuoso (dimetilformamida) con Métóxido de litio y monitoreo con indicador visual (timolftaleína).^[95]

Para conocer el sistema en estudio, se trazó la evolución de los polarogramas de un análisis de tabletas por adiciones estándar de una solución de ANX en NaOH 0.1F como medio de reacción. En la gráfica 35a se muestran los polarogramas obtenidos; en la gráfica 34b se muestra un detalle de la gráfica 35a, donde se observa la disminución de la i_{cat} , conforme aumenta la concentración de analito, característico de la polarografía clásica.

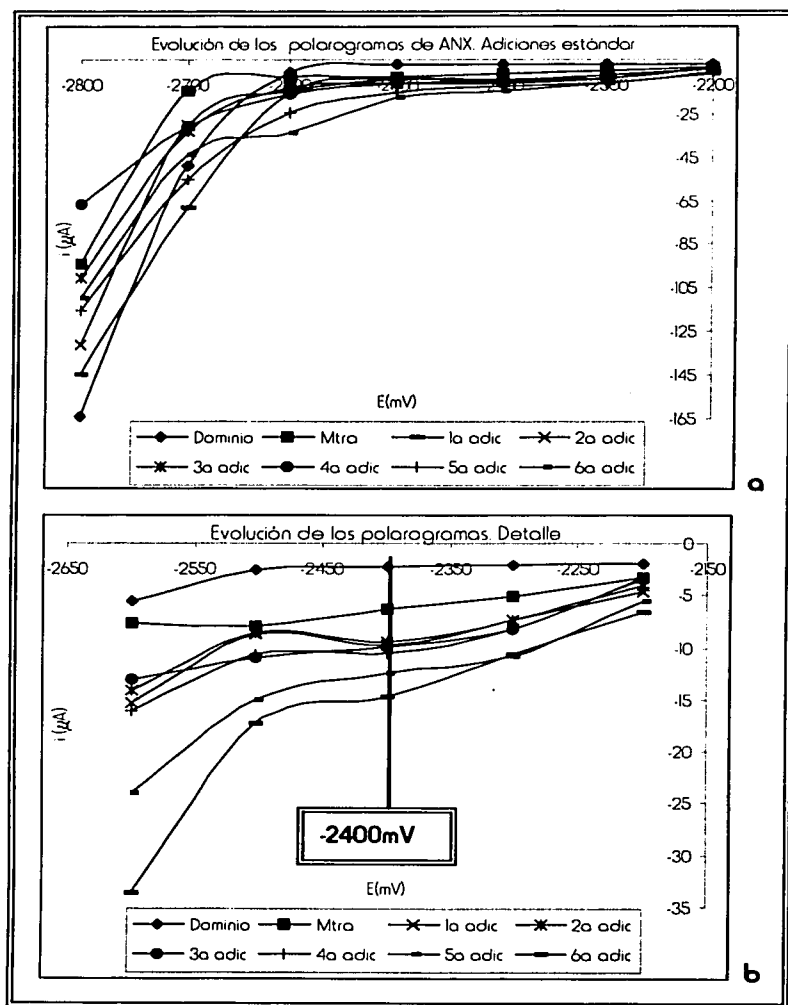


Gráfico 35. Evolución de los polarogramas para concentraciones crecientes de ANX en NaOH 0.1F. En la gráfica **b** se muestra el detalle de la evolución de los mismos, así como el E al cual se oxida el analito, mismo que será utilizada para realizar las determinaciones en la muestra. Et: EGM
 Eref: Ag | AgCl
 Eaux: Acero inoxidable.

Los polarogramas de la gráfica 35 fueron obtenidos con las siguientes condiciones:

- a) $-300 < mV < 2000$
- b) Et: EGM Eref: Ag | AgCl Eaux: Acero inoxidable
- c) $\tau = 10 \text{ s}$
- d) $\Delta E = 100 \text{ mV}$

De la gráfica 35 se obtienen como conclusión que el E al cual ocurre la oxidación del ANX es igual a -2400 mV. Este es el potencial al cual se hará posteriormente las mediciones de i para la determinación de ANX en la muestra. La metodología analítica utilizada fue la de adiciones estándar.

3.3.14 Determinación de ANX en tabletas. Técnica operatoria: Polarografía clásica. Metodología analítica. Adiciones estándar

Para la determinación de ANX en tabletas, se utilizó una muestra de tabletas comerciales de ANX de contenido nominal de 500.0mg por tableta. Se calculó el peso promedio de 5 tabletas, las cuales fueron pulverizadas y homogenizadas en un mortero. A una celda electroquímica se le adicionó 5.0 mL de NaOH 0.1F y se desplazó el oxígeno disuelto mediante una corriente de nitrógeno, grado industrial, durante 15 minutos, con el fin de obtener dominios de electroactividad "limpios", lo cual se observa trazando el polarograma en las condiciones que se mencionan en el apartado anterior. Una vez que se obtuvieron los dominios libres de oxígeno se adicionó a la celda una masa del homogenizado de tableta, alrededor de 10.0 mg, pesados con exactitud. Una vez añadida la muestra de análisis, se hizo pasar nuevamente una corriente de nitrógeno durante un minuto. Al cabo de este tiempo, y con ayuda del M.I.M.P., se impuso un $E = -2300$ mV, y se midió la i a un $\tau = 10$ s con el mismo instrumento.

Posterior a la medición de i , se añadieron 500 μ L de una solución de ANX SRef 0.075 F en agua. Se hizo pasar, nuevamente, una corriente de nitrógeno durante un minuto. Al cabo de este tiempo, se impuso el $E = -2300$ mV y se midió la i al mismo τ . Estos pasos se repitieron entre cada una de las adiciones de la solución de ANX SRef, hasta obtener un mínimo de 5 adiciones estándar. Para conocer la cantidad de ANX que estaba presente en la muestra de análisis, se obtuvo la ecuación de regresión lineal del ensayo, y se llevaron a cabo los cálculos necesarios, tomando en cuenta el volumen de inicio de la celda, así como la corrección por dilución de los valores de i medida en cada adición.

En la gráfica 36 se muestran las rectas obtenidas para cuatro réplicas realizadas. En la tabla XXV se muestran tanto las condiciones de experimentación, así como los resultados obtenidos para cada una de los ensayos realizados.

Gráfica 36. Adiciones estándar a $E=-2300$ mV y $\tau=10$ s para la determinación de ANX por polarografía clásica, en tabletas. Para todos los casos:

Er: EGM

Eref Ag | AgCl

Eaux: Acero inoxidable

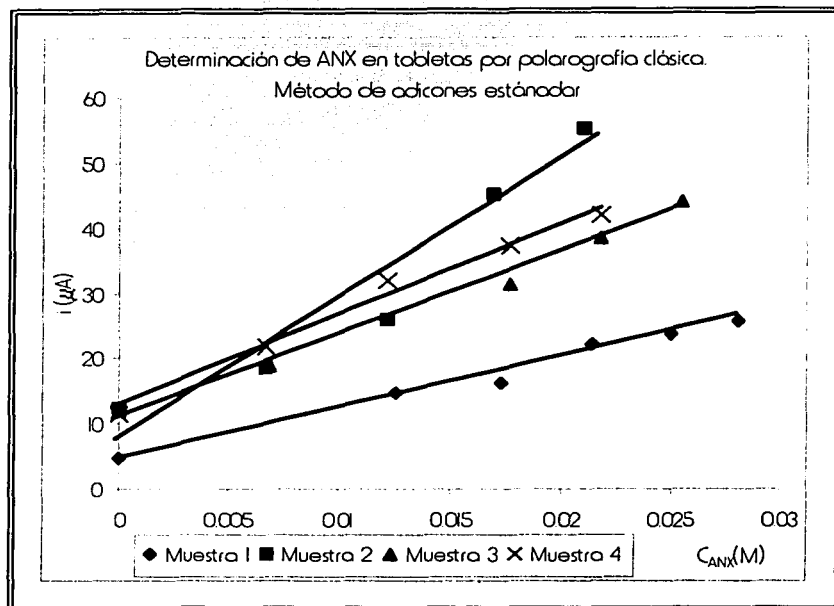


Tabla XXV. Resultados de la determinación de ANX en tabletas por la técnica operatoria de polarografía clásica y la metodología analítica de adiciones estándar. Se muestra el análisis de regresión lineal de cada una de las muestras ensayadas, así como el contenido de principio activo determinado para cada caso.

N° de ensayo	$m_{muestra}$ (mg)	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación	Contenido ANX (%)
1er ensayo	10.9	$y=762.14x + 4.6315$	0.9863	86.1
2do ensayo	10.4	$y=2097.7x + 7.5859$	0.9231	53.7
3er ensayo	10.3	$y=1251.8x + 11.019$	0.9919	131.9
4to ensayo	10.7	$y=1416.8x + 12.398$	0.9865	126.2

Con los datos y los resultados mostrados en la tabla XXV, se determinó que el contenido promedio de ANX en la muestra analizada es de:

Contenido de ANX en tabletas: 99.5%

Además del porcentaje anterior, también se han calculado dos parámetros estadísticos básicos: la S.D. = 36.6963 y el %C.V. = 36.8899%

A pesar de que los parámetros estadísticos reportados no son los aceptables para un trabajo analítico, los resultados experimentales permiten sostener que tanto el método como el sistema son efectivos, y para corroborar la veracidad de los resultados, es necesario llevar a cabo un mayor número de réplicas del experimento, así como una validación del método analítico propuesto.

3.4 Voltamperometría Cíclica.

3.4.1. Determinación cualitativa de la actividad de GOD.

3.4.1.1 Nociones básicas de Voltamperometría Cíclica.^{196,971}

La mejora en la sensibilidad puede obtenerse midiendo con cuidado las corrientes; para separar las corrientes de condensador indiferentes de las corrientes faradaicas analíticamente útiles. Sin embargo, las corrientes faradaicas residuales de la disolución aun permanecen. La mayoría de los métodos voltamperométricos emplean una velocidad de barrido alrededor de 100 mV/min. Este permite que la corriente límite se establezca en valores reproducibles, y por tanto optimizar la precisión y la exactitud.

Sin embargo, un barrido de E mas rápido puede ser útil en la búsqueda de especies electroactivas de la disolución. La técnica operatoria utilizada es la denominada VC, y la velocidad de barrido puede alcanzar hasta 100 V/s. Sin embargo, para uso normal, la velocidad de barrido de E se acerca mas al intervalo de $10 < \text{mV/s} < 1000$. En experimentos de VC, los electrodos y otros componentes de la celda pueden ser los mismos que en cronoamperometría y cronopotenciometría. El E_r puede ser de Au, Pt, C, Hg o cualquier otro material conductor electroquímicamente inerte en el intervalo de barrido de potencial. Como en todas las técnicas voltamperométricas, el barrido de E da por resultado una medida simultánea de la corriente. Sin embargo, no se utilizan impulsos de E o programas especiales de medida de la corriente. Por otro lado, el barrido de E no es unidireccional.

La VC utiliza un programa de perturbación de onda triangular aplicado al E. En la figura 8 se muestra la representación gráfica del programa de perturbación descrito así como la señal típica generada.

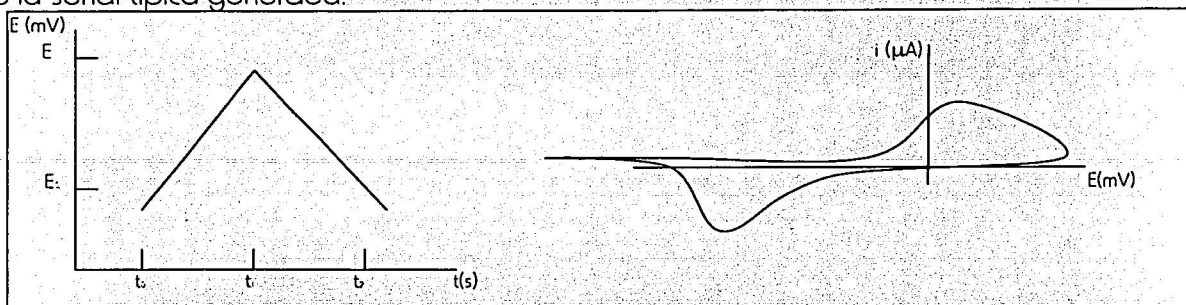


Figura 8. Representación del programa de perturbación utilizado en VC y el voltamperograma típico generado.

En la figura 8 se puede apreciar que después de aplicar una rampa lineal de E entre los tiempos t_1 y t_2 (por lo general unos segundos), se invierte la rampa para llevar de nuevo a E a su valor inicial en el t_3 . Las porciones iniciales a partir de t_1 de las curvas i-E se parecen a polarogramas ordinarios, que constan de una i residual seguida de una "onda catódica". Pero en lugar de estabilizarse al final de la onda, la i disminuye al aumentar más el E. Esta disminución tiene lugar porque desaparece el analito en las proximidades de la superficie del electrodo, y la difusión desde el seno de la disolución es demasiado lenta para restituir la concentración cerca del electrodo. En la curva superior en el momento de máximo E (t_2), la i catódica ha disminuido a un valor muy pequeño. Después de t_2 , el E se invierte, pero continúa una i catódica, porque el E es todavía suficientemente negativo para que tenga lugar la reducción. Cuando el E se hace bastante menos negativo, el producto reducido que se encuentra cerca de la superficie del electrodo empieza a oxidarse. Esta reacción origina un "onda anódica". Finalmente, cuando desaparece el producto reducido, la i anódica disminuye de nuevo hacia su valor inicial en el tiempo t_3 . De esta manera queda explicada la forma de un voltamperograma cíclico típico para un sistema reversible. Del voltamperograma se puede determinar diferentes parámetros electroquímicos de importancia analítica, por ejemplo, la diferencia de E entre picos es inversamente proporcional al número de electrones transferidos (n). Algebraicamente tenemos que:

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.059}{n} \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

La ecuación anterior es para especies electroquímicamente reversibles. Si el sistema no es reversible, los picos se separan más. Del mismo modo, para un par electroquímicamente reversible, el E^0 normal de las especies electroquímicamente electrolizadas es la media de los potenciales pico; algebraicamente:

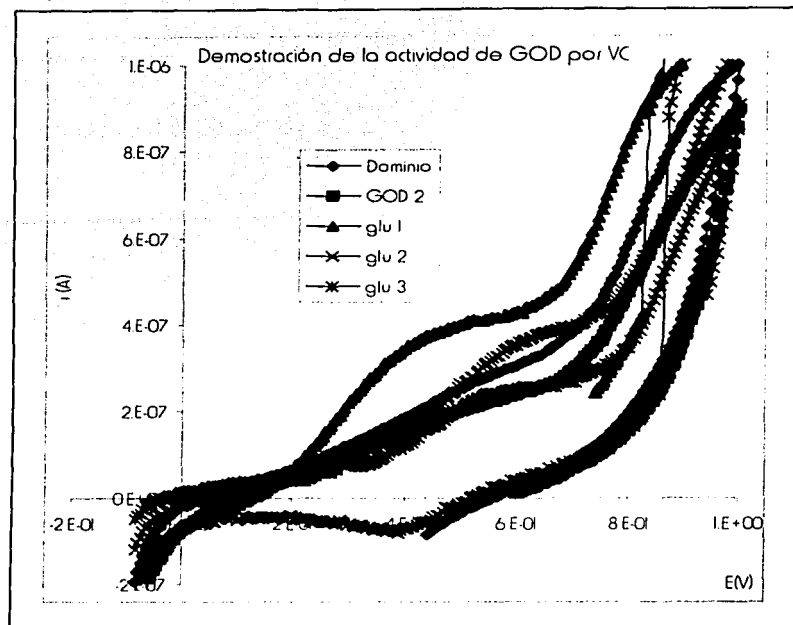
$$E^0 = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2}$$

Finalmente, es importante mencionar que la VC se utiliza para caracterizar el comportamiento redox de los compuestos, y para dilucidar la cinética de reacciones electrónicas. En el presente trabajo se utilizará la VC como una técnica operatoria para la determinación de la actividad de la GOD, y para la determinación de glu en suero en presencia de GOD, ambos en condiciones de miniaturización.

3.4.1.2 Determinación de la actividad de GOD.

Como ya se habrá visto, en dos secciones de este trabajo se ha utilizado a la enzima GOD como elemento bioselectivo para la medición de glu en suero procedente de diferentes voluntarios, tanto sanos como pacientes. Para controlar la calidad de la GOD utilizada, se llevaron a cabo experimentos de VC cuya finalidad fue demostrar que la enzima que se utilizó presentaba actividad catalítica. Para lograr este objetivo, se hicieron los ensayos en condiciones de miniaturización y nuevamente se utilizó el Software llamado VoltaMaster, versión X 9523-2.3, y el potenciostato/galvanostato comercial marca Radiometer Copenhagen modelo PGP 201 para imponer los patrones de perturbación adecuados para la determinación de la actividad de la enzima. En la gráfica 37 se presentan los registros de VC para la demostración de la actividad de GOD que se utilizó. Los voltamperogramas de la gráfica 37 fueron obtenidos en las siguientes condiciones:

- a) Medio de reacción: PBS pH=7.4 $C_{\text{PBS}} = 0.01$ F.
- b) E_r : Au E_{ref} : Cu | Cu(II) | | E_{aux} : Acero inoxidable
- c) $-900 < mV < 1000$
- d) $\tau = 1$ s
- e) $m_{\text{glu}} = 100$ mg



Gráfica 37. Demostración de la actividad de la GOD utilizada en este trabajo. Nótese el cambio en la i en valores de E alrededor de 500 mV debidos a la acción de la GOD en presencia de glu. Para todos los casos:

Er: Au Eref: Cu | Cu(II) | |

Eaux: Acero inoxidable

Los voltamperogramas de la gráfica 37 fueron realizados de la siguiente manera:

- Dominio*. este fue trazado solamente en medio de reacción (PBS pH=7.4 $C_{PBS} = 0.01 F$) con los electrodos ya mencionados. El medio de reacción fue aireado con una bomba de aire durante 15 minutos. Hay que recordar que la GOD es una enzima que requiere de la presencia de oxígeno para poder realizar su actividad enzimática.
- GOD*. este voltamperograma fue trazado en el mismo medio de reacción anterior, pero al que le fue añadido 100 mg de GOD. La solución se agitó mecánicamente durante 1 minuto aproximadamente con el fin de disolver la enzima. Las condiciones de reacción fueron las mismas. Se observa un abatimiento de la i alrededor de 500 mV.
- glu 1, glu 2 glu 3*. estos voltamperogramas fueron trazados en la solución anterior, pero se le fueron añadiendo cantidades de solución de glu 0.01F, tal que la concentración del analito fuese incrementando en cada adición. La solución se homogenizó mediante agitación mecánica. Se suspendió la agitación y se trazó el voltamperograma posterior a cada adición. Nótese el aumento de i alrededor de 500 mV. Este aumento en la corriente alrededor de 500 mV es un indicativo de la acción enzimática de la GOD cuando se encuentra en presencia de glu.

3.4.2 Determinación de glu en suero en presencia de GOD por Voltamperometría Cíclica.

3.4.2.1 Determinación de glu en suero por Voltamperometría Cíclica.

Hasta el momento se han propuesto dos maneras diferentes de determinar glu en suero: por potenciometría a corriente nula y con el uso de un biocomposite con CP. En esta sección se propone el uso de la técnica operatoria de VC, en presencia de GOD como elemento bioselectivo, para la determinación de este analito, que como ya se planteó anteriormente, tiene mucha importancia en la clínica.

Para llevar a cabo la determinación de glu en suero, se realizó la VC de una solución de glu de concentración conocida. En el apartado anterior se demostró que la corriente cambia al estar tanto la enzima como el sustrato presentes en solución, en PBS saturado de oxígeno. Se escogió monitorear la corriente a 600 mV. En la gráfica 38 se presentan los resultados para la determinación de glu en suero. Las condiciones a las que fueron realizadas los voltamperogramas se enumeran a continuación:

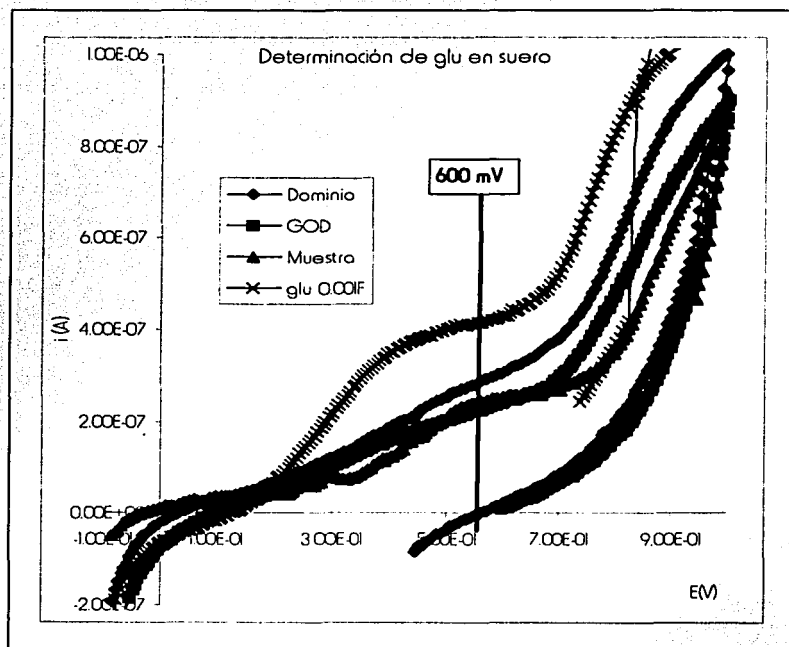
- a) Medio de reacción: PBS pH=7.4 $C_{\text{PBS}} = 0.01 \text{ F}$.
- b) E_r : Au E_{ref} : Cu|Cu(II)|| E_{aux} : Acero inoxidable
- c) $-900 < mV < 1000$
- d) $\tau = 1 \text{ s}$
- e) $V_0 = 1000 \mu\text{L}$ en microcelda

En primer lugar, y al igual que el caso anterior, se saturó de oxígeno al PBS con una bomba de aire durante 15 minutos. Posteriormente se trazó un voltamperograma de 1000 μL de PBS en las condiciones anteriores y se midió la corriente a 600 mV. Esta es la i residual del experimento. Este valor de i se restó a cada una de las mediciones de i realizadas.

En segundo lugar se agregó a la celda 100 μL de una solución de glu 0.01F. Se homogenizó la solución mediante agitación mecánica. Posteriormente se agregó 100 mg de GOD a la solución. Se agitó la solución para homogenizar y permitir que se llevara a cabo la reacción enzimática. Se realizó la VC en las condiciones mencionadas. Se midió la i a 600 mV. A este valor de i se le restó el valor de la i residual y fue corregido por dilución. Este valor de i corregido corresponde al de una solución de glu de concentración conocida en presencia de GOD.

Finalmente, a la celda se le añadió 500 μL de suero de un paciente con Dx de IRC. La solución se homogenizó y se realizó la VC en las condiciones mencionadas. Nuevamente se midió la i a 600 mV. A este valor de i se le restó el valor de la i residual y fue corregido por dilución. Este valor de i corregido corresponde al de la cantidad de glu en presencia de GOD presente en la celda. Haciendo los cálculos pertinentes, y considerando el factor de dilución, se calculó la cantidad de glu en la muestra.

Gráfica 38. Determinación de glu en suero por VC. Nótese el aumento de la i en el $E = 600$ mV, el cual se muestra en la gráfica. Para todos los casos:
 E_r : Au E_{ref} : Cu|Cu(II)||
 E_{aux} : Acero inoxidable



Una vez obtenidos los valores de i para cada uno de los casos presentados en la gráfica 38, se procedió a calcular la cantidad de glu en la muestra de suero. Los valores de i para cada uno de los voltamperogramas de la gráfica 38 se muestran en la tabla XXVI.

Tabla XXVI. Valores de i medidos a partir de los voltamperogramas para la determinación de glu en suero. En la columna denominada i corregida se presentan los valores de i corregidos tanto por la corriente residual como por el efecto de dilución.

Condición	i (μA)	i corregida (μA)
PBS pH=7.4 $C_{\text{PBS}}=0.01\text{F}$	0.2390	—
glu 0.001F + GOD	0.4280	0.2318
Muestra	0.3510	0.3226

El valor de i que corresponde al PBS se denomina *corriente residual*, (i_{res}) que contribuye finalmente al valor de la i cuando están presentes tanto la glu con GOD así como al valor de la i de la muestra, por lo que tiene que ser restado de cada uno de los valores determinados de éstos últimos. Esta resta de i_{res} , se efectúa posteriormente a la corrección del valor de la i debido a la dilución en la celda electroquímica. Para ejemplificar estos conceptos a continuación se describe el cálculo para corregir el valor de i de la glu 0.001F + GOD:

Para el sistema de estudio, el valor de $i_{res} = 0.2390 \mu\text{A}$, en un volumen de PBS, v_o , donde $v_o = 1.0 \text{ mL}$. Cuando se ha agregado glu R.A. 0.001 F en un volumen v , tal que $v = 0.100 \mu\text{L}$, en presencia de GOD, el valor de i es igual a $i = 0.4280 \mu\text{A}$. para corregir éste valor de i , debido a la i_{res} como a la dilución en la celda, se efectuó el siguiente cálculo:

$$i_{\text{corregida}} = \left[i * \left(\frac{v_o + v}{v_o} \right) - i_{res} \right] = \left[0.4280 * \left(\frac{1 + 0.1}{1} \right) - 0.2390 \right] = 0.2318 \mu\text{A}$$

Finalmente, de los datos de la tabla XXVI, se calcularon los niveles de glu en la muestra:

$$C_{\text{glu}} = 3.8172 \text{ mmol/L}$$

Valores de referencia: $3.33 < \text{mmol/L} < 6.11$ ^[49]
 $3.9 < \text{mmol/L} < 5.8$ ^[50]

Como se puede observar, el valor de glu determinado por este método se encuentra dentro de los valores de referencia reportados para este analito en suero. Sin embargo, en preciso mencionar, nuevamente, la necesidad que se tiene de someter esta alternativa a una validación.

4. Microfotocolorimetría.

4.1 Introducción a los métodos ópticos de análisis. ^[98]

4.1.1 Naturaleza de la luz. Interacción luz-materia.

La radiación electromagnética actúa como una fuerza sobre el electrón moviéndolo a través de la unión química. La radiación electromagnética Ultravioleta, Visible (VIS), Rayos X, microondas, radiofrecuencias, etc., son suficientemente débiles que no provocan desplazamientos muy grandes en la unión química.

Una onda electromagnética es una onda transversa cuyo desplazamiento oscila en una dirección perpendicular a la dirección de propagación de la onda.

Es interesante recordar que el principio de superposición establece que dos ondas que viajan a través de una misma región del espacio, su desplazamiento se suma, como ocurre con dos ondas de luz de diferente frecuencia (color). Se dice que una onda es monocromática si todos sus componentes tienen la misma frecuencia (y en consecuencia la misma longitud de onda (λ)). La intensidad de una onda es la energía que fluye a través de una unidad de área perpendicular a la dirección de propagación.

El fenómeno de absorción de luz es similar a establecer de manera permanente y con una frecuencia dada una fuerza directriz sobre la masa suspendida de un resorte. Si se consideran que los electrones en la materia se comportan como si estuvieran unidos a sus respectivos átomos por *resortes*, entonces el efecto de un campo eléctrico oscilante de una onda electromagnética incidente (por ejemplo, una onda de luz) es el dirigir al electrón hacia arriba y hacia abajo contra el resorte que lo sostiene. Si la frecuencia de la radiación electromagnética incidente es diferente que la frecuencia natural de oscilación del sistema electrónico, éste comienza a oscilar emitiendo energía radiante.

Evidentemente, todos los conceptos anteriormente descritos, son representados mediante funciones matemáticas del campo de la óptica. Estas ecuaciones mencionadas, no se presentan en éste trabajo, toda vez que el objetivo de esta sección es ofrecer una noción sobre el efecto de la interacción luz-materia.

4.1.2 Colorimetría, Fotocolorimetría y Espectrofotometría. ¹⁹⁹¹

Pocos son los autores que hacen mención de las diferencias entre estos métodos de análisis ópticos. Pero, es necesario mencionar las diferencias de cada uno de ellos, ya que aun se siguen usando indistintamente, inclusive por los profesionales que los utilizan a diario.

Se dice que la *colorimetría* es aquel método en que el detector es el ojo humano. El mejor ejemplo de este tipo lo constituye el papel pH, el cual cambia de color o adquiere uno en especial según el pH del medio en el cual se ha sumergido. Para determinación de hemoglobina (Hb) se reportó un método de medición con esta técnica, llamado método de Tallqvist. Evidentemente, la determinación de parámetros como el pH o la determinación de Hb en una muestra, da lugar a resultados pobres en exactitud y precisión.

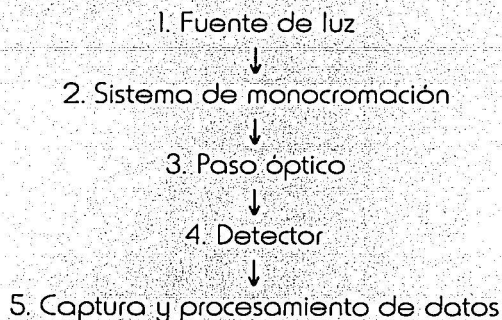
Cuando se sustituye el ojo humano por un detector fotoeléctrico, como los son las fotoceldas o fotorresistencias, y se hace incidir un rayo de luz sobre una muestra que pasa a través de un filtro de un color determinado, se dice que se trata de un método por *fotocolorimetría*. Este método presenta mayor sensibilidad que el colorimétrico, ya que las pequeñas cantidades de luz absorbidas por la muestra pueden ser detectadas por el detector que se use, que por el ojo humano. Sin embargo, la selectividad del método es mínima, y solo sirve para muestras que exhiban máximos de absorción en un intervalo amplio de λ . Evidentemente, la fotocolorimetría no es recomendable para mezclas o muestras dentro de matrices que también absorban. En el caso de la Hb, este es un método recomendable, y de hecho es el que se propone mas adelante.

Finalmente, cuando se ha sustituido el ojo humano por un detector fotoeléctrico, y el filtro de luz ahora es sustituido por un monocromador, como lo es una rejilla de difracción, y se puede filtrar la luz incidente a una λ determinada, tal que sea la mejor para el análisis, se habla de *espectrofotometría*.

4.2 Construcción de equipo para microfotocolorimetría y su funcionamiento.

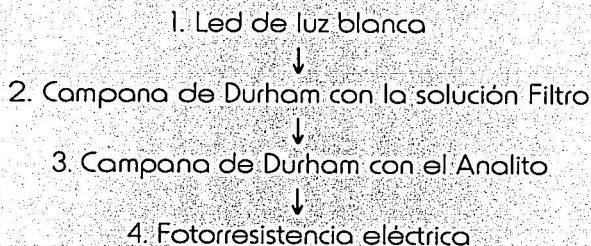
4.2.1 Microfotocolorímetro

Este instrumento está compuesto por los siguientes elementos colocados en línea: ^[100]



Los componentes 1 y 4 están aislados de la luz externa. Los componentes 2 y 3 son colocados en cada nueva jornada de trabajo, dependiendo del sistema de estudio y posteriormente aislados de la luz.

Para la realización de este trabajo los componentes utilizados para desempeñar las funciones antes mencionadas, en el mismo orden, son los siguientes:



La captura y el procesamiento de datos son sustituidos por un multímetro (ohmetro) y una hoja de cálculo, respectivamente. En el anexo 5 se presenta una fotografía del fotocolorímetro construido para este trabajo.

Es pertinente precisar el uso habitual de las campanas de Durham. Una campana de Durham es un tubo de vidrio sellado en uno de sus extremos con un diámetro externo aproximado de 5 mm y una altura aproximada de 2 cm. El volumen de una campana de Durham es de 300 μ L aproximadamente. El uso habitual de las campanas de Durham es en el área de la microbiología. Cuando se preparan los medios de cultivo destinados a pruebas bioquímicas, donde se evalúe la producción de algún gas como parte del proceso metabólico del microorganismo estudiado, la campana de Durham es colocada dentro del tubo de medio cultivo líquido en posición invertida. Si el microorganismo estudiado produce gas durante sus procesos metabólicos, el gas quedará atrapado al interior de la campana de Durham, desplazando el medio de cultivo que estuviese al inicio. Este método de evaluar la producción de gas, además es utilizado para el conteo de microorganismos por la técnica del Número Mas Probable.

En éste trabajo se utilizaron las campanas de Durham como celda para paso óptico, así como el contenedor de la solución monocromadora de luz.

4.2.2 Definición del parámetro adimensional ρT y su determinación experimental.

4.2.2.1 Definición del parámetro ρT por medición de $(R-R_s)/k = (I/I_0)$.

Si se hace incidir un haz de luz monocromada de intensidad incidente I_0 , a través de una disolución que contiene un i-ésimo analito de concentración $[i]$, y a través de una longitud de paso óptico l , la intensidad de la luz en cualquier punto del paso óptico de la disolución, es una función de $[i]$ y de l .

La relación I/I_0 se puede determinar experimentalmente si se mide la respuesta de un detector sensible a la luz. Los detectores usados en fotocolorimetría proporcionan una respuesta (R) en forma de diferencia de potencial o de resistencia eléctrica que puede medirse en un multímetro. Se busca que el detector responda de acuerdo a la siguiente ecuación: ⁽¹⁰⁾

$$R = R_r + kI \quad \text{Tal que} \quad I_u < I < I_{sat}$$

donde R_r es la *respuesta residual*, es decir, la respuesta del detector a la poca luz que se filtra o luz parásita; k es una constante que representa la *rapidez de respuesta lineal* del detector, dR/dI ; I_u es la intensidad umbral, es decir, la mínima cantidad de luz que genera una respuesta lineal del detector; I_{sat} es la intensidad de saturación, es decir, la máxima cantidad de luz que proporciona una respuesta lineal y está caracterizada por $(dR/dI) \rightarrow 0$.

Un detector ideal para fotocolorimetría o espectrofotometría es aquel cuyas características fueran: $R_r \approx 0$; $I_u \approx 0$; $I_{sat} \uparrow$ y $k \uparrow$.

La determinación del cociente I/I_0 , conocido como *Transmitancia*, T , puede efectuarse experimentalmente si se determina R_r (la respuesta del detector con la luz apagada), R_0 (la respuesta de la disolución blanco o medio de reacción) y R_i (la respuesta de la disolución del i -ésimo analito absorbente de concentración molar $[i]$), ya que para el blanco:

$$I_0 = \frac{R_0 - R_r}{k}$$

para la disolución del analito absorbente:

$$I_i = \frac{R_i - R_r}{k}$$

entonces, es posible determinar el parámetro adimensional pT , por medio de la medición de la R del detector, de la siguiente manera.

$$T = \frac{I_i}{I_0} = \frac{R_i - R_r}{R_0 - R_r}$$

Esta sección tiene como propósito demostrar que con instrumentación sencilla es posible determinar el parámetro adimensional T y con éste, un segundo parámetro adimensional, $-\log T$, es decir, el pT , conocido comúnmente como absorbancia: ^[102]

$$A = -\log T = pT$$

La absorbanza o pT está asociado a los valores de concentración de disoluciones tanto de estándar como de analitos absorbentes presentes en alguna muestra.

4.2.2 Determinación experimental del parámetro pT .

Como ya se mencionó, el objetivo de esta sección es demostrar que con instrumentación sencilla es posible determinar el parámetro pT . Para ello, se utilizará el microfotocolorímetro descrito anteriormente. El sistema monocrómador es una solución de Rojo N° 2 de concentración 108×10^3 mg/mL. Esta solución proporciona un filtro de color rojo, ya que las disoluciones de la especie absorbente utilizada ^[103], el complejo de cobre $Cu(NH_3)_4^{2+}$, son de color azul ^[104], color complementario del rojo ^[105]. Para asegurar que ambas disoluciones son de colores complementarios, se trazó el espectro de absorción, $pT=f(\lambda)$ de cada una de ellas. En la gráfica 39 se muestra la complementariedad de espectros para ambas disoluciones, o sea, sus λ de máxima absorción (λ_{max}) se encuentran suficientemente resueltos. Una vez que se ha demostrado que tanto la solución filtro como analito presentan espectros de absorción complementarios, se trazó la curva de calibración, $pT=f(C_{Cu(NH_3)_4^{2+}})$, para la determinación del pT . Las soluciones utilizadas se presentan en la tabla XXVII. El complejo de cobre se preparó a partir de una solución estándar de $Cu(NO_3)_2$ 10 mF en medio amoniacal amortiguado (AmBS) $pH=9.2$, $C_{AmBS}=2M$.

Gráfica 39. Espectros de absorción, $pT=f(\lambda)$ del Rojo N°2 (Filtro) y del complejo de cobre $Cu(NH_3)_4^{2+}$ (Analito). Se observa que a la λ_{max} del analito, la absorción del filtro es mínima, por lo que el Rojo N°2 es adecuada para utilizarse como filtro de luz.

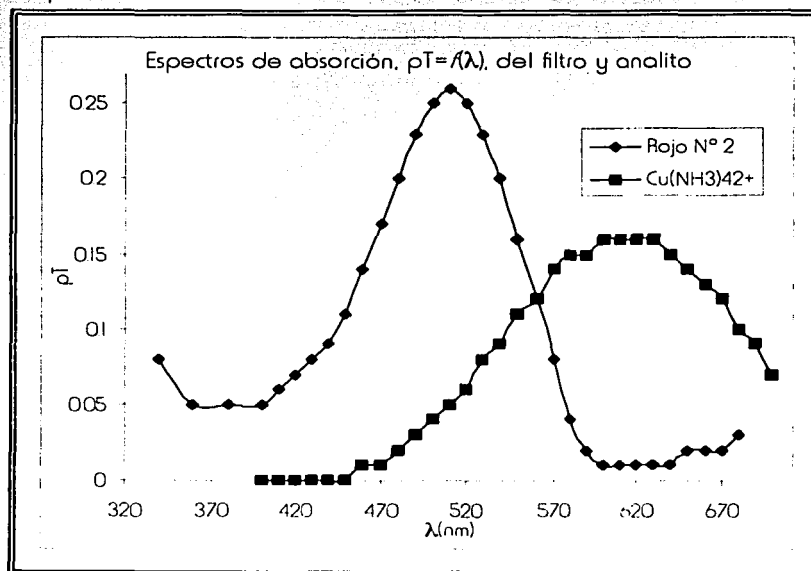


Tabla XXVII. Soluciones utilizadas para la construcción de la curva de calibración y posterior determinación del ρT .

Solución	$C_{Cu(NH_3)_4^{2+}}$ (mF)
0 (AmBS)	0
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

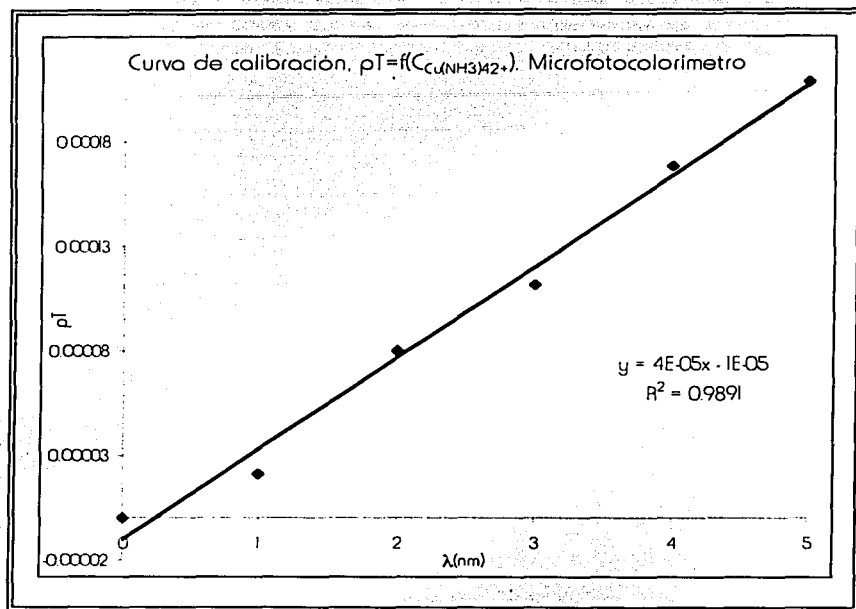
Con las soluciones descritas en la tabla XXVII se construyó la curva de calibración, $\rho T = f(C_{Cu(NH_3)_4^{2+}})$, previa medición de la respuesta del detector al hacer incidir sobre cada una de ellas la luz monocromada por el filtro. Es importante mencionar que la medición de la respuesta de cada una de las soluciones fue realizada cinco veces, y se trabajó el promedio de las respuestas para la determinación del ρT y la posterior construcción de la curva de calibración. Los resultados de las mediciones de la respuesta, y el ρT asociado a cada una de las muestras se presentan en la tabla XXVIII.

Tabla XXVIII. Resultados para la determinación del ρT del sistema $Cu(NH_3)_4^{2+}$ y Rojo N°2. Nótese que la muestra denominada "cero" corresponde al blanco.

Muestra	R_i prom. ($K\Omega$)	$(R_i - R_r)$	$T = (R_i - R_r) / (R_o - R_r)$	$\rho T = -\log T^*$
R_r	1052			
0	$R_o = 3.304$	-1048.696	1	0
1	3.352	-1048.648	0.99995	20.9×10^6
2	3.498	-1048.502	0.99981	80.3×10^6
3	3.574	-1048.426	0.99974	111.8×10^6
4	3.710	-1048.290	0.99961	168.2×10^6
5	3.808	-1048.192	0.99952	208.8×10^6

*NOTA: $\rho T = -\log T = \text{Absorbancia}$

De acuerdo a la concentración de cada una de las soluciones utilizadas en la tabla XXVII, y los resultados de ρT de la tabla XXVIII de las mismas disoluciones, se construyó la curva de calibración, $\rho T=f(C_{Cu(NH_3)_4^{2+}})$, que se muestra en la gráfica 40.



Gráfica 40. Curva de calibración, $\rho T=f(C_{Cu(NH_3)_4^{2+}})$, para el sistema de determinación experimental del ρT . Nótese que la respuesta es lineal.

Tanto en la gráfica 40, como en la tabla XXVIII se demuestra que la determinación experimental del ρT es posible sin la necesidad de circuitos operacionales, además se demuestra que se pueden obtener curvas de calibración lineales con esta alternativa a espectrofotometría de absorción en el VIS realizada con instrumentos comerciales.

4.3 Determinación de Hemoglobina en sangre total.

4.3.1 Características generales de la hemoglobina. ^(109, 110, 111)

La historia primitiva de la química de las proteínas es, esencialmente, la de la Hb. Su brillante color rojo, su amplia difusión y su fácil aislamiento, la han hecho objeto de investigación desde la antigüedad. La observación de la proteína cristalizada fue descrita por primera vez en 1849 y alrededor de 1909 ya se había publicado un atlas fotográfico de cristales de Hb procedentes de 109 especies. La Hb fue una de las primeras proteínas en las que se determinó con exactitud su masa molecular, la primera proteína que se caracterizó por ultracentrifugación y la que se asoció con una función fisiológica específica y, en la anemia de la célula falciforme, la primera en la que demostró que una mutación puntual provocaba el cambio de un aminoácido. La Hb no es simplemente un depósito de oxígeno. Más bien se trata de un sistema de distribución de oxígeno muy sofisticado, que proporciona la cantidad de oxígeno apropiada a los tejidos en una variedad de circunstancias.

Aunque el eritrocito maduro no tenga núcleo, no es un cuerpo inerte. El elemento más importante en el eritrocito es la Hb. La Hb es una proteína tetramérica, $\alpha_2\beta_2$, de forma esférica. La Hb transporta oxígeno, desde los pulmones, las agallas o la piel de un animal hasta sus capilares, para emplearlo en la respiración. Los organismos muy pequeños no necesitan de esta proteína porque sus necesidades respiratorias se satisfacen por la simple difusión pasiva del oxígeno a través de sus cuerpos. La evolución de los organismos grandes y complejos, necesita, por tanto, el desarrollo de sistemas circulatorios que transporten activamente el oxígeno y los elementos nutritivos hasta los tejidos. La sangre de tales organismos debe contener un transportador de oxígeno, como la Hb, ya que la solubilidad del oxígeno en el plasma sanguíneo es demasiado baja ($\sim 10^{-4}$ M en condiciones fisiológicas) para transportar suficiente oxígeno para atender las necesidades metabólicas. Por el contrario, la sangre completa puede transportar oxígeno en concentraciones tan elevadas como 0.001 M, casi la misma que el aire.

Cada una de las cuatro subunidades de la Hb se halla unidas de modo no covalente a un grupo *hemo*. Este es el mismo grupo que se encuentra en los citocromos y en algunas enzimas redox. El hemo es el responsable del color rojo característico de la sangre y el sitio en que cada monómero de globina se une con una molécula de oxígeno. Las globinas son las proteínas sin el grupo hemo que forman parte de la Hb. El sistema de anillos del hemo es un derivado de la porfirina, que está constituido por cuatro anillos de pirrol unidos por puentes meteno. La porfirina del hemo se le conoce con el nombre de *protoporfirina IX*. El hemo, entonces, es la protoporfirina IX con un átomo de Fe central unido. En la Hb, el átomo de Fe permanece, normalmente, en el estado de oxidación Fe(II) (Ferroso), se halle o no oxigenado. El Fe(II) de la Hb puede oxidarse a Fe(III) para formar metahemoglobina (mHb); esta última no se una al oxígeno. El color marrón de la sangre seca y de la carne vieja es debido a la mHb. Los eritrocitos contienen a la enzima *metahemoglobina reductasa*, que convierte las pequeñas cantidades de mHb que se forman espontáneamente en la forma de Fe(II).

Es importante mencionar que, además de ser un transportador de oxígeno, la Hb desempeña un papel importante en el transporte de CO₂. La estructura de la Hb está tan delicadamente equilibrada que cambios estructurales pequeños pueden convertirla en no estructural. Se conocen cerca de 400 variedades mutantes de Hb. Casi la mitad de ellas son inocuas, ya que son el resultado de cambios en los restos de aminoácidos superficiales. Sin embargo, las alteraciones de los restos internos rompen, con frecuencia, la estructura de la Hb, lo que provoca un Dx de anemia hemolítica.

Normalmente se encuentran tres tipos de Hb en los eritrocitos: HbA, HbA₂ y HbF. Todas están formadas por dos cadenas alfa y otras dos cadenas. La HbA es la prevalente en el adulto, y es la Hb que está compuesta por dos cadenas alfa y dos cadenas beta ($\alpha_2\beta_2$); la HbA₂ constituye el 3.5% de la Hb de los eritrocitos y está formada por dos cadenas alfa y dos delta ($\alpha_2\delta_2$); en el adulto existe además una pequeña cantidad de Hb fetal (HbF), la cual llega normalmente al 2% de la Hb y esta formada por dos cadenas alfa y dos cadenas gama ($\alpha_2\gamma_2$).

4.3.2 Importancia de la determinación de Hemoglobina. Enfoques de laboratorio. Anemia.

La anemia es un trastorno hematológico caracterizado por la disminución de los valores normales de Hb y/o de eritrocitos, así como la disminución del hematocrito. La disminución de Hb es una condición para el Dx de anemia, o sea, si no existe una disminución de los niveles de Hb, no hay anemia. La anemia es una manifestación secundaria de un proceso primario, a excepción de las anemias hemolíticas hereditarias. Los síntomas del cuadro anémico dependen de la severidad del mismo, la velocidad con que se instaure la anemia, el factor causal y la salud del corazón, ya que si el paciente cursa con alguna cardiopatía y anemia el mismo tiempo, se incrementa el riesgo de paro circulatorio. Es importante mencionar que la anemia no es una enfermedad como tal, sino un Sx. Los síntomas presentes en el cuadro anémico son los siguientes:

- a) *Fatiga*: el cansancio y la fatiga se debe a la hipoxia.
- b) *Palidez de tegumentos*: se trata de un síntoma meramente subjetivo, ya que depende del tipo de luz en se hace la evaluación.
- c) Falta de brillo en la piel; cabello delgado y quebradizo.
- d) *Esplenomegalia*: aumento del tamaño del bazo, por lo tanto existe plenitud posprandial.
- e) *Laxitud*.
- f) Pérdida de reflejos osteo-tendinosos.
- g) *Somnolencia*.
- h) *Irritabilidad*.
- i) *Coiloniquia y Poloniquia*: Deformación de las uñas y existencia de manchas blancas en las mismas, respectivamente.
- j) *Esclerótica*: Tono de piel opalescente en condiciones de salud. No confundir con palidez.
- k) *Lengua lisa*: causada por la deficiencia de hierro.
- l) *Lengua geográfica*: lengua agrietada con desepitelización, causado por la deficiencia de vitamina B₁₂ y Folatos.
- m) *Alteraciones gustativas*, caracterizado por ingerir sustancias poco comunes, *Pica*: causado por la deficiencia de hierro.
- n) *Alucinaciones olfatorias*: Causado por la deficiencia de vitamina B₁₂.
- ñ) *Disnea y Taquipnea*: La disnea puede aparecer con pequeños esfuerzos.
- o) *Ritmos sistólicos plurifocales*. (Soplo sistólico plurifocal)
- p) *Flatulencia y meteorismo*
- q) Dificultades digestivas: eructos e hipos.
- r) En mujeres: trastornos menstruales; en hombres: pérdida de la libido sexual

La etiopatogenia de las anemias puede ser de cuatro tipos:

1. *Falla medular*: Infiltración a la médula ósea o por destrucción de la misma debida a un efecto físico, como la radiación.
2. *Anemias carenciales*: La médula ósea se encuentra en condiciones de salud adecuadas, pero hay carencia de hierro, folatos y vitamina B₁₂ y por lo tanto la disminución de Hb.
3. *Anemias por pérdida*: Hemorragias.
4. *Anemia hemolítica*: Las causas pueden ser propias del eritrocito (Hereditarias) o ajenas al mismo (Adquiridas)

Existen varias clasificaciones de las anemias, pero la más útil es la que se basa en la morfología celular. Otra clasificación se basa en la cuenta de reticulocitos. En la tabla XXIX se presentan los diferentes tipos de anemia, de acuerdo al criterio de su clasificación.

Tabla XXIX. Clasificación de las anemias de acuerdo a dos criterios diferentes. ^[112]

Criterio de clasificación	Tipo de anemia	Comentarios
Morfología celular	Normocítica Normocrómica	Disminución de Hb, de eritrocitos y de hematocrito. Frotis normal
	Microcítica Normocrómica	Poco común. Manifestación de inflamaciones crónicas
	Microcítica Hipocrómica	Tipo de anemia más común. Alteración de índices hematológicos
	Macrocítica	Macrocitosis importante
Cuenta de reticulocitos	Hiperregenerativa	Cuenta de reticulocitos elevada
	Normoregenerativa	Cuenta de reticulocitos normal
	Hiporegenerativa	Cuenta de reticulocitos disminuida
	Aregenerativa	Ausencia de reticulocitos

Después de haber revisado brevemente los tipos de anemia que se pueden presentar, se nota la importancia de la medición de los niveles de Hb en sangre. Existen varios métodos para la determinación de Hb, los cuales se discuten brevemente en la siguiente sección, haciendo énfasis en el método empleado en éste trabajo.

Sin embargo, debe ser recordado constantemente por los clínicos, patólogos y químicos analistas de laboratorio que la adecuación de los instrumentos y métodos para la medición de Hb no constituye una garantía de que los resultados particulares en algún laboratorio sean del todo adecuados. ^[13] La buena calidad del material volumétrico es básica y su exactitud debe ser comprobada por algún método adecuado. El material debe de mantenerse limpio, y el material que este deteriorado debe de ser desechado. Debe de observarse una estricta precisión al tomar los volúmenes requeridos de muestra, ya que cualquier error resulta sumamente magnificado. Las muestras de sangre venosa debe ser bien mezclados con el anticoagulante, y la mezcla debe ser a conciencia, inmediatamente antes de tomar la muestra de análisis para la medición de la Hb.

Los colorímetros utilizados deben de ser calibrados con una precisión máxima para el método en particular a emplearse. La calibración de todos los instrumentos debe de ser comprobada de tiempo en tiempo, de preferencia semanalmente.

En casos de anemia severa, resulta difícil la determinación exacta de Hb, pero un químico experimentado debe de ser capaz de mantenerse en un error inferior al 5% en estos casos, especialmente si se recurre a volúmenes dobles de sangre. En las determinaciones rutinarias de Hb, debe esperarse una exactitud con variaciones en límites de 2% aproximadamente.

4.3.3 Principio de la determinación de Hemoglobina. ^[14]

Existen tres métodos principales para la determinación de Hb en sangre: el método de la cianometahemoglobina (mHbCN), el método de la oxihemoglobina y el método de la hematina alcalina. Hay poco que elegir en lo que se refiere a exactitud entre los métodos que requieren el empleo de fotocolorímetros, aunque el método de la hematina alcalina es probablemente el menos exacto. El método de Sali, o de la hematina ácida, es aún menos exacto, puesto que el color que desarrolla no es estable y empieza a desaparecer tan pronto llega a su máximo. Existe un cuarto método, el de la cianhemitina, pero no presenta ninguna ventaja en particular respecto a los métodos mencionados y, por el contrario, presenta la desventaja de requerir el uso de mayores cantidades de NaCN. En éste trabajo, para la determinación de Hb, se utilizará el método de la mHbCN.

Esencialmente, el método consiste en diluir sangre en una solución que contienen NaCN y $K_3Fe(CN)_6$. Esta solución recibe el nombre de *Reactivo de Drabkin*. El reactivo de Drabkin, además de contener NaCN y $K_3Fe(CN)_6$ contiene además $NaHCO_3$. A continuación se describe el uso de cada uno de éstos componentes del reactivo de Drabkin:

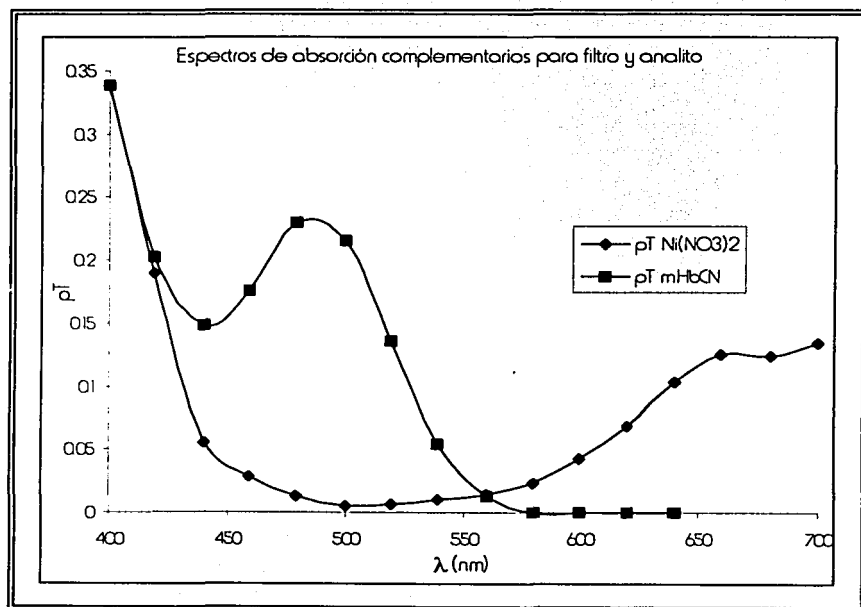
NaHCO₃. Esta base débil impone al reactivo un pH aproximado de 8.6. A este nivel de acidez ocurre, inevitablemente, la hemólisis de la muestra, lo que conlleva a la liberación de la Hb que se encuentra dentro del eritrocito.

K₃Fe(CN)₆. Una vez que se ha liberado la Hb, la cual tiene al elemento Fe en su estado de oxidación (II). Este compuesto, el $K_3Fe(CN)_6$ presenta propiedades redox de tipo oxidante, por lo que oxidará el Fe(II) a Fe(III), dando lugar a la formación de mHb. Recordar que la diferencia entre la Hb y la mHb, es el estado de oxidación del Fe, los cuales son (II) y (III) respectivamente.

NaCN. Ya formada la mHb, en presencia del ión CN⁻ se forma el complejo mHbCN, el cual es estable durante un periodo largo de tiempo (horas), lo que representa una ventaja cuando se hace determinaciones en gran un número de muestras.

La Hb, la mHb y la carboxihemoglobina (aunque no la sulfahemoglobina) son convertidas rápidamente en mHbCN. La absorción ejercida por la solución se determina en un fotocolorímetro con un filtro amarillo-verdoso, o en un espectrofotómetro a una $\lambda=540 \text{ nm} \pm 5$. Esta es una ventaja que ofrece el método; otra ventaja que ofrece, es que la lectura no debe de llevarse a cabo de inmediato, necesariamente después de la dilución. El uso de NaCN en la preparación del reactivo de Drabkin es una desventaja, aún cuando la solución diluyente solo contiene 50 p.p.m. de NaCN, y es relativamente inocua. Otra posible desventaja, es que una vez realizada la dilución de la muestra con el reactivo de Drabkin, se debe dejar reposar la reacción a temperatura ambiente, por lo menos durante 10 minutos, con el fin de asegurar la conversión completa de todas las formas de Hb presentes a mHbCN. Es importante mencionar que la velocidad de conversión a mHbCN se ve marcadamente retardada en muestras que contienen CO. Una vez concluido el tiempo de reposo, se deben centrifugar las muestras a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, con el fin de separar los restos celulares de la solución, y que éstos no interfieran en la medición.

Como se puede observar, se recomienda el uso de un filtro amarillo-verdoso como sistema monocromador de luz para la determinación de Hb por el método de la mHbCN. En el presente trabajo se ensayó una solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 0.1 F como filtro de luz. Para comprobar la eficiencia de la solución propuesta como filtro, se trazaron los espectros de absorción, $\rho T=f(\lambda)$, para el filtro y el analito, o sea, la mHbCN, con sus respectivos blancos. En la gráfica 42 se muestran los espectros de absorción complementarios para el filtro propuesto y el analito.



Gráfica 41. Espectros de absorción, $\rho T=f(\lambda)$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (Filtro) y del complejo mHbCN (Analito). Se observa que a la λ_{max} del analito, la absorción del filtro es menor, por lo que el $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ es adecuado para utilizarse como filtro de luz.

4.3.4 Determinación de Hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina. Técnica operatoria: Fotocolorimetría de absorción en el VIS. Metodología analítica: Curva de calibración $\rho T=f(C_{mHbCN})$.

El primer paso en la determinación de Hb total por el método propuesto, fue la elaboración de la curva de calibración; $\rho T=f(C_{mHbCN})$, a partir de Hb estándar, lo cual tiene una concentración de 15.4 g/dL. Se prepararon 400 μL de Hb estándar a una concentración igual a 3.08 g/dL. A partir de esta solución se hicieron cinco soluciones de concentración variable y conocida para elaborar la curva de calibración. A cada una de las soluciones se les midió la resistencia cuando se les hacía incidir un rayo de luz monocromada por un filtro a base de solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 0.1 F. En la tabla XXX se presentan las soluciones con las cuales se realizó la curva de calibración.

Tabla XXX. Soluciones de mHbCN utilizadas para la construcción de la curva de calibración para determinación de Hb en sangre. Se preparó un volumen total de 400 μL de cada una de las soluciones estándar.

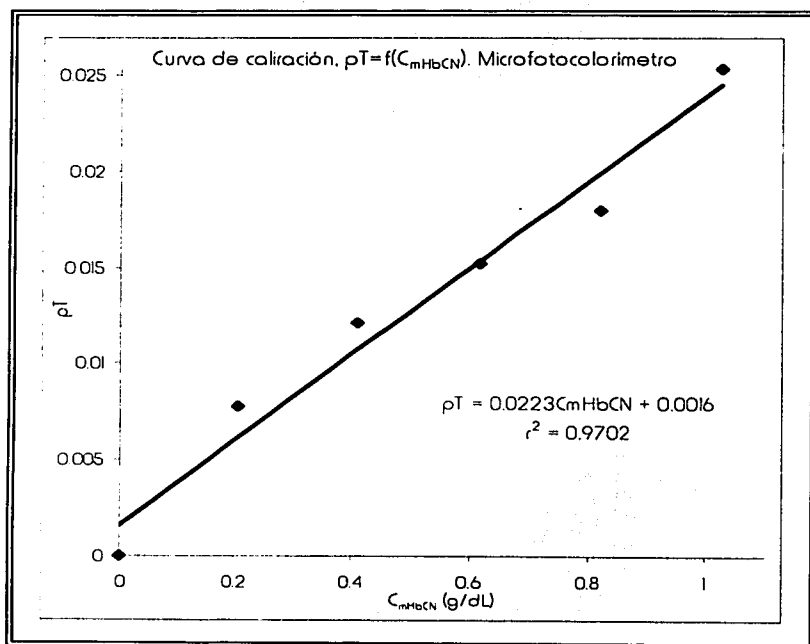
Solución	C_{mHbCN} (g/dL)
0 (Reactivo de Drabkin)	0
1	0.2053
2	0.4107
3	0.6160
4	0.8213
5	1.0267

Con las soluciones presentadas en la tabla XXX se construyó la curva de calibración, $\rho T=f(C_{mHbCN})$, en el microfotocolorímetro construido. A cada una de las soluciones se les midió la respuesta del detector (resistencia eléctrica) cuando eran iluminadas a través de un filtro verde (solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) comparadas contra un blanco de reactivo de Drabkin (solución cero). Cada medición se realizó ocho veces. En la tabla XXXI se presentan los resultados de las mediciones realizadas para cada una de las soluciones de la tabla XXX, así como la determinación del parámetro T y del parámetro ρT de cada una de ellas.

Tabla XXXI. Resultados para la realización de la curva de calibración del sistema mHbCN y Ni(NO₃)₂. Nótese que la solución denominada "cero" corresponde al blanco.

Muestra	Ri prom. (KΩ)	T=(Ri-Rr)/(Ro-Rr)	pT=-logT
Rr	99.2		
0	Ro=12.113	1	0
1	13.663	0.9822	0.0078
2	14.5	0.9726	0.0121
3	15.1	0.9657	0.0152
4	15.650	0.9594	0.018
5	17.05	0.9433	0.0253

En la gráfica 42 se muestra la curva de calibración realizada a partir de las soluciones de la tabla XXX y los resultados de la tabla XXXI.



Gráfica 42. Curva de calibración, $pT=f(C_{mHbCN})$, para el sistema de determinación de Hb en sangre. Nótese que la respuesta es lineal.

Con la curva de calibración obtenida y presentada en la gráfica 42, se determinó el contenido de Hb en cuatro muestras de voluntarios sanos. Las muestras fueron procesadas de la siguiente forma:

- a) A 100 μ L de muestra se le agregaron 4.5 mL de reactivo de Drabkin en un tubo de ensaye de 13 X 100
- b) Se tapó el tubo y la muestra se homogenizó por inversión durante cinco veces aproximadamente.
- c) La muestra se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- d) Concluido el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a 4000 r.p.m. durante 10 minutos.
- e) Se determinó el pT del sobrenadante en el microfotolorímetro usando como blanco reactivo de Drabkin. Para la determinación del pT, se midió la respuesta del detector. La determinación del pT se realizó de la misma forma que se ha descrito anteriormente.

En la tabla XXXII se muestran los resultados para la determinación de Hb en las muestras analizadas, por el método de la mHbCN, usando un microfotolorímetro. En la misma tabla se presentan los valores de Hb calculados a partir de la curva de calibración y el valor de pT determinado para cada una de las muestras. En la tabla XXXIII se muestran los valores de referencia por grupo de población.

Tabla XXXII. Resultados para la determinación de Hb por el método de la mHbCN usando un microfotolorímetro.

Muestra	Género	R (K Ω)	pT	C _{Hb} (g/dL)
1	Masculino	14.3	0.0111	21.6
2	Masculino	14.2	0.0105	20.4
3	Femenino	13.7	0.0080	14.6
4	Femenino	13.7	0.0080	14.6

Tabla XXXIII. Valores de referencia de niveles normales de Hb por grupo de población. ⁽¹¹⁵⁾

Grupo	C_{Hb} (g/dL)
Mujeres	12 < g/dL < 14
Mujeres embarazadas	11 < g/dL < 14
Hombres	13 < g/dL < 18
Neonatos	13 < g/dL < 19

Como se puede observar en los resultados de la tabla XXXII, y comparándolos con los valores de referencia de la tabla XXIII, se determinaron valores de Hb, que si bien no todos caen dentro de los valores de referencia, si se encuentran muy cerca de los límites, además de que se presentó una concordancia de acuerdo al género. Es importante, nuevamente, repetir el experimento con un número mayor de muestras, y hacer un análisis estadístico riguroso, sin embargo, se observa que si es posible llevar a acabo la determinación de Hb por el método de la mHbCN con el fotocolorímetro descrito, como alternativa al uso de espectrofotómetros comerciales.

CONCLUSIONES

- ✓ Se observa que con los instrumentos fabricados en condiciones de laboratorio, se obtiene una respuesta cuando se utilizan con fines analíticos (medición, caracterización e identificación).
- ✓ Como se menciona en gran parte de éste trabajo, es necesario llevar a cabo todo el desarrollo analítico de cada uno de los métodos aquí propuestos, toda vez que el objetivo de esta tesis es demostrar que los instrumentos sirven como una alternativa a los instrumentos convencionales comerciales.
- ✓ Los resultados aquí presentados demuestran que es factible la propuesta para la determinación de otros analitos de interés fármaco-biológico, inclusive son de interés en otras áreas como la Química Ambiental, la Química de Alimentos, la Química Legal, etc.
- ✓ Los ensayos con los instrumentos aquí presentados, y que fueron realizados con grupos de alumnos, de profesores de México y en el extranjero, demuestran la viabilidad de trabajar a nivel de grupos.

Referencias

1. A. P. Kreshkov, A. A. Yaroslávstev. **Curso de Química Analítica. Análisis Cuantitativo.** 1ª edición. URSS, 1985. Edit. MIR. pp. 122-124
2. P. Díaz Arista. **Construcción de un Microsensor a Q_{H} . (No Membranal) para Determinar Potenciométricamente el pH.** Tesis de licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M., 2001.
3. K. Nombra, Y. Ujihira. **Response of Oxide Films on Stainless Steel as a pH Sensor.** *Anal. Chem.* 60, (1988), 2564.
4. J. Valenzuela. **Determinación Selectiva de la Actividad de H^+ en Medio Acuoso y No Acuoso por Electrodo Sólidos No Membranales.** Tesis de licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M., 1996
5. J. Ruzicka. **The Seventies-Golden Age for Ion Selective Electrodes.** *J. Chem. Ed.* 74, (1997), 167-170
6. B. P. Nikolski, M. M. Shultz. *Z.Z. Fiz. Khim.* 36, (1962), 704
7. G. Eisenman, D. C. Ruskin, J. H. Casby. *Science* 126, (1957), 831
8. B. H. Vossos, E. W. Ewing. **Electroquímica Analítica.** 1ª edición. México, 1988. Edit. Limusa. pp. 62-67
9. G. Gran. *Anal. Chem. Acta.* 206, (1988), 111
10. D. C. Harris. **Quantitative Chemical Analysis.** 5th edition. U.S.A. 1999. Edit. Freeman and Co. pp.
11. L. A. Kaplan, J. A. Pesce **Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation.** 3rd edition. U.S.A. 1996. Edit. Mosby. Pág. 1043

12. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** 6ª edición. México, 1994. Secretaría de Salud. pp. 364-365
13. J. Tay, R. Lara, O. Velasco, M. Gutiérrez. **Parasitología Médica.** 5ª edición. México, 1995. Méndez editores. pp. 49-50, 65
14. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** 6ª edición. México, 1994. Secretaría de Salud. pp. 656-657
15. J. S. Fritz. **Acid-base Titrations in Non-Aqueous Solvents.** 1ª edición U.S.A. 1973. Edit. Allyn and Bacon Inc. Pág. 20
16. D. C. Harris. **Análisis Químico Cuantitativo.** 2ª edición. España, 2001. Edit. Reverté S.A. pp. 264-268
17. S. I. Rapaport. **Introducción a la Hematología.** 2ª edición. México, 1993. Salvat Editores S.A. pp. 54-55
18. F. Orozco. **Análisis Químico Cuantitativo.** 8ª edición. México, 1975. Edit. Porrúa S.A. pp. 262-263, 266-267
19. A. Baeza, J. Ramírez. **Valoraciones Bifásicas: Determinación de Principios Activos en Medicamentos a $p(V_0/V_a)$ Impuesto con Monitoreo Potenciométrico del Punto Final.** *ALDEQ 98-99.* 197-201
20. M. Valcárcel, A. Gómez. **Técnicas Analíticas de Separación.** 1ª edición. España, 1988. Edit. Reverté. pp. 247, 252, 258, 260-261
21. L. A. Kaplan, J. A. Pesce **Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation** 3ª edición. U.S.A. 1996. Edit. Mosby. pp. 456-459
22. A. Mather. **Chloride, Direct Mercurimetric Titration** (provisional). En W. R. Faulkner, S. Meites., **Selected Methods of Clinical Chemistry.** USA, 1982. Edit. American Association for Clinical Chemistry. Vol. 9. pp. 153-155

23. S. Levinson. **Chloride, Colorimetric Method** En W. R. Faulkner, S. Meites., **Selected Methods of Clinical Chemistry**. USA, 1982. Edit. American Association for Clinical Chemistry, Vol. 9. pp. 143-148
24. A. A. Dietz, E. E. Bond. **Chloride, Coulometric-Amperometric Method** En W. R. Faulkner, S. Meites., **Selected Methods of Clinical Chemistry**. USA, 1982. Edit. American Association for Clinical Chemistry, Vol. 9. pp. 149-152
25. T. Ono, J. Taniguchi, H. Mitsumaki. **A New Enzimatic Assay of Chloride in Serum**. *Clin. Chem.* 34, (1988), 552-553
26. K. Emancipator. M. H. Kroll. **Bromide Interference: Is Less Really Better?**. *Clin. Chem.* 36, (1990), pp. 1470-1473
27. A. J. Pesce. L. A. Kaplan. **Química Clínica. Métodos**. 1ª edición. Argentina 1987. Edit. Médica Panamericana. Pág. 1313
28. L. A. Kaplan, J. A. Pesce **Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation** 3rd edition. U.S.A. 1996. Edit. Mosby. Pág. 459
29. A. J. Pesce. L. A. Kaplan. **Química Clínica. Métodos**. 1ª edición. Argentina 1987. Edit. Médica Panamericana. pp. 121-126
30. L. A. Kaplan, J. A. Pesce **Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation** 3rd edition. U.S.A. 1996. Edit. Mosby. pp. 614-616, 619-626, 629-630.
31. P. E. Cruer. J.E. Gerich. **Glucose Countregulation, Hypoglycemia and Intensive Insulin Therapy in Diabetes Mellitus**. *N. Engl. J. Med.*, 131, (1985), 232-241
32. S. J. Chan, P. Keim. D. F. Steiner. **Cell-free Synthesis of Rat Preproinsulin: Characterization and Partial Amino Acid Sequence Determination**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, (1976), 1976

33. U. H. Unger, L. Orci. **Glucagon and the A Cell.** *N. Engl. J. Med.* 304, (1981), 1518-1524; 1575-1580
34. A. Kaplan, R. Jack, K. E. Opheim, B. Toivola, A. W. Lyon. **Clinical Chemistry. Interpretation and Techniques.** 4th edition. USA, 1995. Edit. Williams & Wilkins. pp. 207-210
35. S. Dinnen, J. Gerich, R. Rizza. **Carbohydrate Metabolism in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.** *N. Engl. J. Med* 327, (1992), 707-713
36. M. A. Atkinson, N. K. Maclaren. **The Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.** *N. Engl. J. Med.* 331, (1994), 1428-1436
37. A. S. Krolewski, J. H. Warran, L. I. Band, C. R. Kahn. **Epidemiologic Approach to the Etiology of Type I Diabetes Mellitus and its Complications.** *N. Engl. J. Med.* 317, (1987), 1390-1398
38. National Diabetes Data Group. **Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance.** *Diabetes*, 28, (1979), 1039-1057
39. D. R. Gamble, K. W. Taylor, **Seasonal Incidence of Diabetes Mellitus** *Br. Med. J.* 3, (1969), 631
40. E. Hinden. **Mumps Followed by Diabetes.** *Lancet*, 1, (1962), 1381
41. G. M. Jonson, R. B. Tudor. **Diabetes Mellitus and Congenital Rubella Infection,** *Am J. Dis. Child*, 120, (1970), 453
42. M. Miodovnik, F. Mimouni, R. C. Sang, **Glycemic Control and Spontaneous Abortion in Insulin-Dependent Diabetic Women.** *Obstet. Gynecol.* 68, (1986), 366-369
43. R. Schwartz. **Hiperinsulinemia and Macrosomia.** *N. Engl. J. Med.* 323, (1990), 340-342

44. D. M. Nathan. **Long-term Complications of Diabetes Mellitus.** *N. Engl. J. Med* 328, (1923), 1676-1685
45. D. Bananuch, W. Brümmer, W. Ebeling. **Glucose-Deshidrogenase für Die Glucose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten.** *Z. Klin. Biochem.* 13, (1975), 101-107
46. I. Björkhem, R. Blomstrand, O. Falk, G. Ohman. **The Use of Mass Fragmentography in the Evaluation of Routine Methods for Glucose Determination.** *Clin Chem. Acta*, 72, (1976), 353-362
47. Department of Health, Education and Welfare. Food and Drug Administration. In Vitro Diagnostic Products for Human Use. Proposed **Establishment of Product Class Standards for Detection or Measurement of Glucose.** Federal Register 39, No. 126, 24136-24147, 1974
48. L. A. Kaplan, J. A. Pesce **Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation** 3rd edition. U.S.A. 1996. Edit. Mosby. pp 634-635
49. A. J. Pesce, L. A. Kaplan. **Química Clínica. Métodos.** 1^ª edición. Argentina 1987. Edit. Médica Panamericana. Pág. 127
50. L. A. Kaplan, J. A. Pesce **Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation** 3rd edition. U.S.A. 1996. Edit. Mosby. Pág. 635.
51. B. H. Vassos, E. W. Ewing. **Electroquímica Analítica.** 1^ª edición. México, 1988. Edit. Limusa. Pág. 225
52. R. T. da Rocha, I. G. R. Gutz, C. L. do Lago. **A Low Cost and High Performance Conductivity Meter.** *J. Chem Ed.* 74, (1997), 572-574
53. J. M. Hiller, M. S. Mohan, M. J. Brand. **A Nonaqueous Conductimetric Titration for the Analysis of Alkaloids in Cigarette Tobacco.** *J. Chem Ed.* 56, (1979) 207-208

54. E. L. Wynder, D. Hoffman. **Tobacco and Tobacco Smoke**. Academic Press Inc. Boston, 1973
55. C. L. Ogg, W. W. Jr. Bates, E. Cogbill, L. S. Harrow, E. L. Petersen. *Assoc. Anal. Chemists J.* 43, (1960), 524
56. R. H. Cunduff, C. P. Marcunas. *Assoc. Anal. Chemists J.* 43, (1960), 519
57. E. L. Wynder, D. Hoffman. **Tobacco and Tobacco Smoke**. Academic Press Inc. Boston, 1973
58. R. M. Navari. *J. Chem. Ed.* 51, (1974), 748
59. I. H. Pierce. *J. Lab. Clin. Med.* 26, (1941), 1322
60. D. Sawyer, W.R. Heineman, J. M. Beebe. **Chemistry Experiments for Instrumental Methods**. 1ª edición. USA, 1984. Edit. John Wiley & Sons. Pág 70
61. R. D. Lafleur, J. C. Mayland, K. B. Oldham. **Analytical Microelectrode Voltammetry with Minimal Instrumentation**. *Electroanalysis* 2, (1990), 223-228
62. F. Alvarez, A. Baeza. **Micropolarógrafo de Mínima Instrumentación**. *Memorias de XVI Congreso Nacional de Química Analítica*. Querétaro, Agosto, 2001
63. J. Heyrovsky. **The Processes at Dropping Mercury Cátodo. I General Introduction. II Hydrogen Overpotential**. *Transactions of Faraday Society*. 19, (1924), 692-702; 785-789.
64. R. Lozano, M. T. Martín, M. Martín. **Jaroslav Heyrovský: en el Centenario de su Nacimiento**. *Educ. Quim.* 2, (1991), 36-39
65. J. Alpizar, F. Albertus, A Llerena **Fundamentos de los Métodos Electroquímicos de Análisis**. 1ª edición. Cuba, 1980. Edit. ENSPES. pp. 207-208
66. A. J. Bard, L. R. Faulkner. **Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications**. 2ª edición. USA, 2001. Edit. John Wiley & Sons. pp. 156-159

67. A. L. Méndez Gutiérrez. **Determinación Electroanalítica de Peróxido de Hidrógeno a Nivel Trazos**. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M., 2002
68. H. A. Laitinen, I. M. Kolthoff. *J. Am. Chem. Soc.* 61, (1939) 3344
69. H. A. Laitinen. *Trans. Electrochem. Soc.* 82, (1942), 289
70. E. B. Feldman. **Principios de Nutrición Clínica**. 1ª edición. México, 1990. Edit. El Manual Moderno. pp. 377-380
71. R. A. Jacob. **Assessment of Human Vitamin C Status**. *J. Nutr.* 120(suppl. 11), (1990), p.p. 1480-1485
72. H. E. Sauberlich. **Ascorbic Acid**. En R. F. Labbe. **Clinics in Laboratory Medicine**. Vol. 1. USA, 1977. Edit. Plenum Publishing.
73. S. Englard, S. Seifter. **The Biochemical Functions of Ascorbic Acid**. *Annu. Rev. Nutr.* 6, (1986), 265-304
74. S. S. Mirvish. **Effects of Vitamin C and E on N-nitroso Compound Formation, Carcinogenesis and Cancer**. *Cancer*, 58, (1986) 1842-1850
75. F. P. Perera, D. Tango, R.A. Grinberg-Funes. **Molecular Epidemiology of Lung Cancer and the Modulation of Markers of Chronic Carcinogen Exposure by Chemopreventive Agents**. *J. Cell Biochem. Suppl* 17F, (1993), 119-128
76. A. Bendich. **Physiological Role of Antioxidants in the Immune System**. *J. Dairy Sci.* 76, (1993), 2789-2794
77. S. Koltry, L. Šucha. **Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry**. 1ª edición. USA, 1985. Edit. John Wiley & Sons. Pág. 249
78. Y. I. Turyan, R. Kohen. *J. Electroanal. Chem.* 380, (1995), 273
79. R. W. Ramette. **Equilibrio y Análisis Químico**. 1ª edición. USA, 1983. Edit. Fondo Educativo Interamericano. Pág. 425

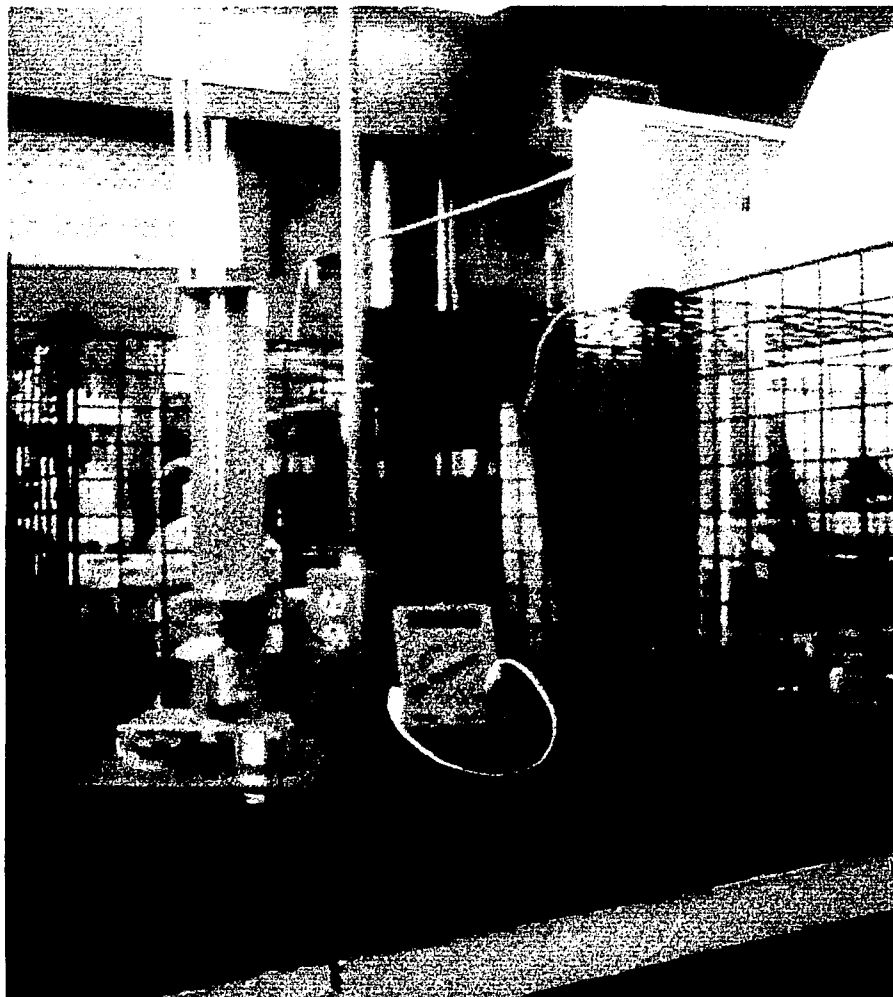
80. D. C. Harris. **Análisis Químico Cuantitativo**. 1ª edición. México, 1992. Grupo Editorial Iberoamérica. Pág. 330
81. J. Mitchell, D. M. Smith. *Aquamestry*. Parts 1-3. 2nd edition. USA, 1980. Edit. Willey-Interscience.
82. B. Bellenger. **Dosificación del agua; en Análisis Químico Farmacéuticos de Medicamentos**. Ed. por D. Pradeau. 1ª edición. México, 2001. Noriega Editores. pp. 935-939
83. K. A. Connors. **A Textbook of Pharmaceutical Analysis**. 3rd edition. USA, 1982. Edit. John Wiley & Sons. pp. 499-503
84. P. Pollet. **Etat de l'eau dans les lyophilisats**. Tesis de doctorado en Farmacia. UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris V.
85. K Fischer. *Angew. Chem*, 48, (1935), 394
86. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**. 6ª edición. México, 1994. Secretaría de Salud. pp. 684-69
87. J. D. M. Neuss, G. O'Brien, H. A. Frediani. *Anal. Chem.* 23, (1951) 1332
88. W. P. Bryan. P. B. Rao, *Anal. Chem. Acta.* 84, (1976), 149
89. O. Popovich, R. P. T. Tomkins. **Nonaqueous Solutions Chemistry**. 1ª edición. USA, 1981. Edit. John Wiley & Sons
90. **The Merk Index**. 11th edition. USA, 1989 Pág. 11
91. A. Baeza Reyes. **Control del Mecanismo de Electroreducción de Moléculas Orgánicas por Imposición del Nivel de Acidéz en Medios Apróticos**. Tesis de doctorado (Química Analítica). Facultad de Química, U.N.A.M., 1997. Págs. 18-19
92. J. Wang, Ü. A. Kirgöz, J. Mo, J. Lu, A. N. Kawde, A. MucK. **Glassy Carbon Paste Electrodes**. *Electrochemistry Communications*, 3, (2001), 203-208

93. A. J. Pesce. L. A. Kaplan. **Química Clínica. Métodos.** 1ª edición. Argentina 1987. Edit. Médica Panamericana. Pág. 127
94. J. G. Hardman. L. E. Limbird. P. B. Molinoff. R. W. Ruddon. A. Goodman Gilman. **Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.** Vol. II. 9ª edición. México, 1996. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana. pp 1132-1135
95. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** 6ª edición. México, 1994. Secretaría de Salud. pp. 660-661
96. D. C. Harris. **Análisis Químico Cuantitativo.** 2ª edición. España, 2001. Edit. Reverté S.A. pp. 479-481
97. K. A. Rubinson. J. F. Rubinson. **Análisis Instrumental.** 1ª edición. España, 2001. Edit. Pearson Educación. pp. 260-264
98. A. Baeza. **Métodos Ópticos de Análisis. Interacción luz-materia.** Facultad de Química, UNAM.
99. A. Baeza. Comunicación personal. México, 1997.
100. H. H. Willard. L. L. Merritt. J. A. Dean. F. A. Settle. **Métodos Instrumentales de Análisis.** edición. 1991. Grupo Editorial Iberoamérica. Pág. 115
101. C. Reilley. C. M. Crawford. **Principles of Precision Colorimetry. A General Approach to Photoelectric Spectrophotometry.** *Anal. Chem.* 27, (1955), 716.
102. **Spectrometry Nomenclature.** *Anal. Chem.* 46, (1974), 2257
103. A. Baeza. **Determinación del pT por Medición de (R-Rs)/k=(Ii).** Facultad de Química, 1996. Ejercicio práctico I.
104. F. Burriel. F. Lucena. S. Arribas. J. Hernández. **Química Analítica Cualitativa.** edición. 1988. Edit. Paraninfo. Pp
105. R. A. Day. A. L. Underwood. **Química Analítica Cuantitativa.** 5ª edición. México, 1989. Edit. Prentice Hall. Pág. 461
106. J. G. Hardman. L. E. Limbird. P. B. Molinoff. R. W. Ruddon. A. Goodman

- Gilman. **Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.**
Vol. II. 9ª edición. México, 1996. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana. Pág 1056
107. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** 6ª edición. México, 1994.
Secretaría de Salud. Pág. 513
108. M. Valcarcel. M. Silva. **Teoría y Práctica de la Extracción Líquido-Líquido.** 1ª
edición. México, 1984. Pág. 301
109. D. Voet. J. G. Voet. **Bioquímica.** 1ª edición. España, 1992. Ediciones Omega
pp. 227-229, 239, 247, 261
110. M. J. Lynch. S. S. Raphael. L. D. Mellor. P. D. Spare. M. J. H. Inwood. **Métodos
de Laboratorio.** Vol. I. 2ª edición. México, 1977. Nueva Editorial
Interamericana. Pág. 743
111. A. J. Pesce. L. A. Kaplan. **Química Clínica. Métodos.** 1ª edición. Argentina 1987.
Edit. Médica Panamericana. Pág. 1256
112. M. J. Lynch. S. S. Raphael. L. D. Mellor. P. D. Spare. M. J. H. Inwood. **Métodos
de Laboratorio.** Vol. I. 2ª edición. México, 1977. Nueva Editorial
Interamericana. pp. 767-769 (Vol. II)
113. M. J. Lynch. S. S. Raphael. L. D. Mellor. P. D. Spare. M. J. H. Inwood. **Métodos
de Laboratorio.** Vol. I. 2ª edición. México, 1977. Nueva Editorial
Interamericana. Pág. 753
114. J. V. Dacien. **Hematología Práctica.** 2ª edición. España, 1970. Edit. Toray.
pp. 34-36
115. R. Nieto. G. González. et. al. **Manual de Hematología.** Facultad de Química,
UNAM. México, 1998

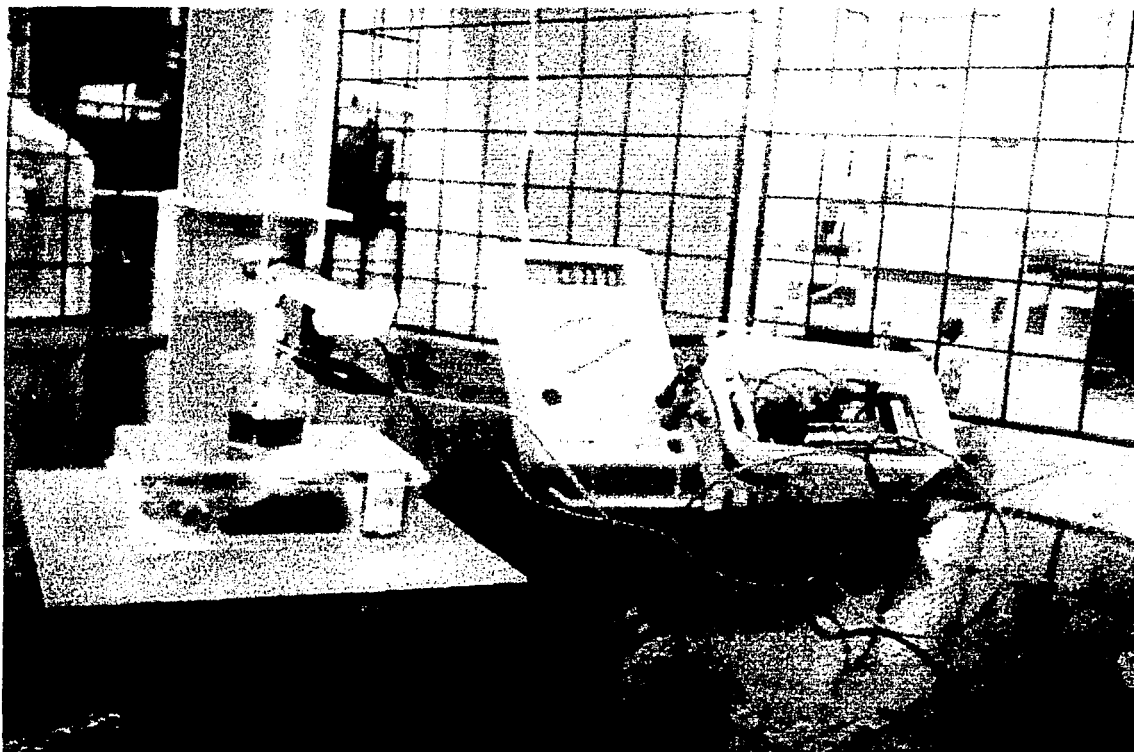
Anexo 1

Microbureta de 2 mL, Microagitador magnético y uso de microelectrodos para potenciometría.



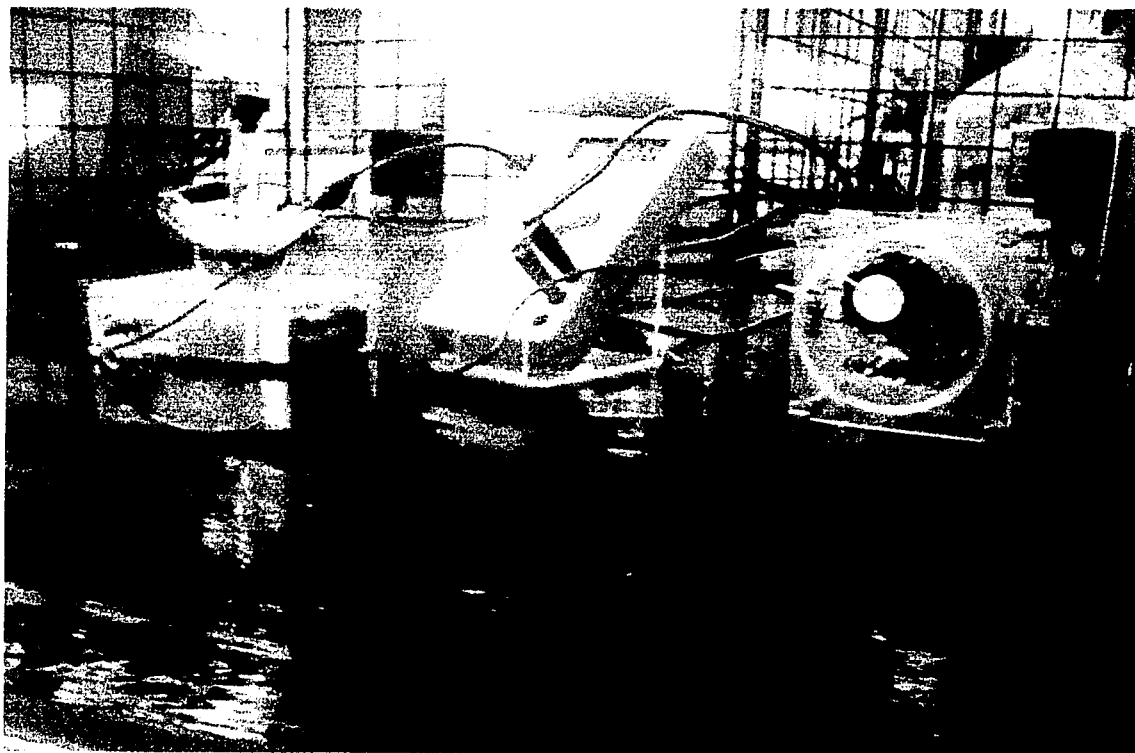
Anexo 2

Microoscilador y su uso en conductimetría.



Anexo 3

M.I.M.P. y microcelda de tres electrodos para uso en técnicas electroquímicas potenciodinámicas.



Anexo 4

Sistema de determinación de agua por el método de Karl Fischer a microescala.



Anexo 5

Microfotocolorímetro y celdas para fotocolorimetría.

