



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

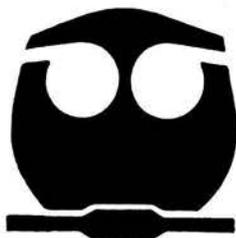
FACULTAD DE QUÍMICA

QUÍMICA MICROANALÍTICA:  
DETERMINACIONES CLÍNICAS Y FARMACÉUTICAS CON  
MICROFOTOCOLORÍMETRO DE  
MÍNIMA INSTRUMENTACIÓN  
(MIMC)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:  
JUAN MANUEL MARTÍNEZ NÚÑEZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.

2004



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.

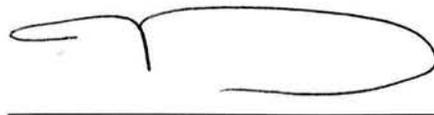
Jurado asignado:

Presidente	Profa. Luz Mercedes Sánchez Hidalgo y Rojas
Vocal	Prof. Alberto Gómez Pedroso Gudiño
Secretario	Prof. José Alejandro Baeza Reyes
1er. Suplente	Profa. María Elena Castilla Madrigal
2do. Suplente	Prof. José de Jesús García Valdés

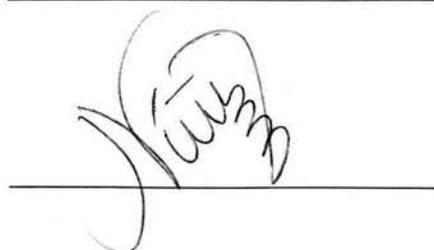
Trabajo realizado en:

Laboratorio de Electroquímica Analítica, Investigación y Enseñanza Experimental.  
Anexo 3E y 3F. Facultad de Química, UNAM.

Asesor: José Alejandro Baeza Reyes



Sustentante: Juan Manuel Martínez Núñez



Cuando mueras, serás del todo sepultada,  
se desvanecerá tu pálida memoria,  
y tu nombre, enterrado quedará en la nada.  
Pues nada hiciste nunca por alcanzar la gloria,  
dejarás de existir tras la pompa mortuoria  
y muerta vagarás entre sombras heladas

*Safo*



# P R E F A C I O

---

Una obra que llevó su tiempo prepararla y obtener sus numerosos y útiles resultados no puede quedar sin difundirse. Sería un egoísmo absurdo actuar de esta manera. Ningún trabajo de investigación puede mejorarse si no se somete a la crítica constructiva de la comunidad científica; y es precisamente siguiendo esta directriz, que el presente trabajo se ha presentado en los siguientes congresos:

- *XVI Congreso Nacional de Química Analítica de la Asociación Mexicana de Química Analítica*. Agosto 13 a 17 de 2001 con el título:

## **“MICROESCALAMIENTO EN MÉTODOS ÓPTICOS DE ANÁLISIS”**

Universidad Autónoma de Querétaro  
Santiago de Querétaro, Querétaro, México

- *XVIII Congreso Nacional de Química Analítica de la Asociación Mexicana de Química Analítica*. Junio 30 a Julio 2 de 2004 con el título:

## **“Gráficas de Ringbom y curvas ponderadas $pT = f(\text{Conc})$ con Microfotocolorímetro de Mínima Instrumentación (MIMC) de bajo costo para la enseñanza de la ley de Lambert-Beer”**

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Pachuca de Soto, Hidalgo, México

Está por presentarse en:

- *El V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química de la Sociedad Cubana de Química*. Octubre 2004 con el título:

## **“QUÍMICA MICROANALÍTICA: DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO CON MICROFOTOCOLORÍMETRO DE MÍNIMA INSTRUMENTACIÓN (MIMC) DE BAJO COSTO”**

La Habana, Cuba

Dio lugar a una publicación:

- La primera en la *Revista Cubana de Química* con el título: Química Microanalítica: Determinación de ácido acetilsalicílico con Microfotocolorímetro de Mínima Instrumentación (MIMC) de bajo costo. (Ver apéndice C)

## PREFACIO

*Química Microanalítica: Determinaciones Clínicas y Farmacéuticas con Microfotocolorímetro de Mínima Instrumentación (MIMC)* pretende convencer, a través de sus resultados, del beneficio de la implementación de las técnicas a microescala total en los laboratorios dedicados a la enseñanza de la química experimental, que por cierto, en el mundo ya se está tendiendo hacia esta práctica. Esperamos que el esmero, el cuidado y la dedicación, que fueron reactivos adicionales de cada experimento, hagan su contribución para lograr este ambicioso objetivo.



## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

MIMC: Siglas en inglés de Microfotocolorímetro de Mínima Instrumentación.

MIMC's: Plural de MIMC.

HPLC: Siglas en inglés de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

FEUM: Siglas de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

Ec.: Ecuación.

Fig.: Figura.

[*i*]: concentración *i*-ésima ó de la *i*-ésima especie.

*l*: longitud de paso óptico

R: Respuesta

R<sub>r</sub>: Respuesta residual

R<sub>*i*</sub>: Respuesta de la *i*-ésima especie.

I<sub>o</sub>: Intensidad de radiación incidente inicial.

I: intensidad de radiación emergente.

T: Transmitancia

A: Absorbancia

pT: Absorbancia

W: Símbolo químico del tungsteno.

K: grados Kelvin

μm: micrómetro.

nm: nanómetro.

mm: milímetro

λ: longitud de onda

C<sub>o</sub>: concentración inicial

C: concentración

I<sub>r</sub>: intensidad de radiación incidente

V: voltios

AAS: ácido acetilsalicílico

®: registrado (a)

ATP: Adenosín trifosfato.

GOD: Glucosa Oxidasa

POD: Peroxidasa

mg: miligramo

dL: decilitro

mM: milimolar

AS-Fe: Compuesto de coordinación formado por hierro en estado de oxidación 3+ y salicilato.

MΩ: Megaohmios

KΩ: Kiloohmios

mL: mililitro

KΩ: Kiloohmios

1er.: primer.	NA: No aplica
2do.: segundo	S: Varianza
3er.: tercer	%AAS: Porcentaje de ácido acetilsalicílico
cm: centímetro	RT: Reactivo de trabajo
MIMC 1: Primer prototipo de MIMC	°C: grados centígrados
MIMC 2: Segundo prototipo de MIMC	LOG: logaritmo base 10.
MIMC 3: Tercer prototipo de MIMC	°: grados
min: minuto o minutos	rpm: revoluciones por minuto
µg: microgramo	cbp: cuanto baste para
M: molar	STD: Estándar.
AS: ácido salicílico	<i>m</i> : muestra
R <sup>2</sup> ó r <sup>2</sup> : coeficiente de correlación lineal.	I <sub>2</sub> -I: Yodo yodurado.
g: gramos	PBS: Siglas en ingles de solución buffer de fosfatos.
S <sup>2</sup> : Desviación estándar.	vpf: volumen de punto final
CV %: Coeficiente de variación	CNmHb: Ciano-metahemoglobina.



# C O N T E N I D O

---

## Introducción, objetivos e hipótesis... 1

Introducción.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	2
Referencias.....	3

## Capítulo 1:

### Principios de Fotocolorimetría..... 4

Absorción de la energía radiante.....	4
Ley límite de Lambert-Beer-.Bouger.	10
Instrumentación óptica.....	12
Fuentes de radiación.....	13
Selectores de longitud de onda.....	13
Celdas de absorción.....	18
Fotodetectores.....	19
Registrador.....	21
Procesador.....	21
Referencia de capítulo.....	22

## Capítulo 2:

### Determinaciones propuestas..... 23

Determinación cuantitativa de glucosa en suero sanguíneo.....	23
Determinación cuantitativa de AAS en tabletas de Aspirina®.....	24
Referencias de capítulo.....	26

## Capítulo 3:

### Diseño y construcción de MIMC's..... 27

Diseño de MIMC's.....	27
Diseño general.....	27
Diseño del 1er prototipo de MIMC.....	28
Diseño del 2do prototipo de MIMC.....	28
Diseño del 3er prototipo de MIMC.....	29
Construcción de MIMC's.....	30
Construcción del 1er prototipo de MIMC...30	
Construcción del 2do prototipo de MIMC...32	
Construcción del 3er prototipo de MIMC...34	

Materiales y reactivos de capítulo.....	35
Referencias de capítulo.....	35

## Capítulo 4:

### Caracterización de los MIMC's... 36

La respuesta residual: ¿medición o determinación?.....	36
Uso de una resistencia.....	36
La respuesta residual encontrada por extrapolación.....	37
Comportamiento de la respuesta con y sin la utilización de un regulador de voltaje.....	38
Efecto del filtro de absorción.....	39
Materiales y reactivos de capítulo.....	40
Referencias de capítulo.....	40

## Capítulo 5:

### Ensayos preliminares..... 41

Efecto del filtro de absorción en las curvas de calibración de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en medio amoniacal concentrado.....	41
Metodología.....	42
Resultados.....	42
Determinación del pT.....	42
Relación lineal entre la señal óptica y la concentración.....	43
Reducción del número inicial de longitudes de onda incidentes sobre el filtro.....	45
¿Cómo determinar el intervalo de concentraciones de trabajo? Las gráficas de Ringbom: la solución.....	45
Metodología.....	46
Determinación de la zona lineal, del límite de detección y del límite de cuantificación.....	46
¿Se mejora el coeficiente de correlación lineal trabajando en el intervalo de concentraciones encontrado?.....	48
Materiales y reactivos de capítulo.....	49
Referencias de capítulo.....	49

Capítulo 6:	Capítulo 8:
Determinación cuantitativa de AAS en tabletas de Aspirina® .....51	Otras Aplicaciones.....73
Elección del filtro de absorción.....51	Curvas de calibración de I <sub>2</sub> -I con MIMC 1.....73
Determinación del intervalo de concentraciones de trabajo por medio de las gráficas de Ringbom.....52	Curvas de calibración de proteínas con reactivo de Biuret y MIMC 2.....74
Las curvas ponderadas para estimar errores o límites de confianza.....54	Valoraciones volumétricas con detección óptica del volumen de punto final.....75
Cuantificación de AAS en tabletas de Aspirina® .....56	Materiales y reactivos de capítulo.....76
Metodología.....56	Referencias de capítulo.....77
Resultados.....57	Conclusiones.....78
Pruebas de significación. Comparación de las medias de dos métodos.....60	Perspectivas.....80
Materiales y reactivos de capítulo.....61	APENDICE A: Colección de espectros de absorción.....81
Referencias de capítulo.....61	APENDICE B: Fotos.....93
Capítulo 7:	APENDICE C: Artículo.....96
Determinación cuantitativa de glucosa en suero sanguíneo humano .....62	
Elección del filtro de absorción.....63	
Determinación del intervalo de concentraciones de trabajo por medio de las gráficas de Ringbom.....63	
Curvas de calibración ponderadas de glucosa en medio enzimático.....64	
Cuantificación de glucosa en suero sanguíneo.....67	
Metodología.....67	
Resultados.....69	
Pruebas de significación. La prueba <i>t</i> por parejas.....70	
Materiales y reactivos de capítulo.....71	
Referencias de capítulo.....72	



## INTRODUCCIÓN

Los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopias atómica y molecular <sup>[1]</sup>, y que por más de cincuenta años han tenido gran aplicación en el análisis químico. En los últimos años, estas técnicas se han reemplazado en numerosos análisis cualitativos y cuantitativos por otras técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) o la cromatografía de gases. Estos cambios se ven muy marcados en las recientes ediciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y sus respectivos suplementos. A pesar de esto, los métodos ópticos de análisis son y seguirán siendo ampliamente utilizados, y en muchos casos como la técnica de primera elección, por las ventajas que representa, principalmente por el relativo bajo costo del equipo comparado, por ejemplo, con el de los equipos cromatográficos, y la simplicidad del análisis.

Actualmente, las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) emitidas a través de la Secretaría de Ecología y la Secretaría de Marina y Recursos Naturales establecen los límites máximos permisibles de contaminantes que pueden descargarse al medio ambiente, y enfocan su contenido hacia la disminución de residuos <sup>[2][3][4]</sup>. Ante esta situación, los laboratorios dedicados al análisis químico y que se consideren éticamente profesionales, deben adecuar sus actividades a la disminución de desechos, es decir, realizar sus actividades a nivel microescala.

En la UNAM existe el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (antes Centro de Instrumentos) en el que se lleva a cabo investigación tecnológica en diferentes áreas, entre las que se encuentran óptica aplicada, sensores, materiales, metrología y la enseñanza experimental de la ciencia. Aunque sus investigaciones y desarrollos sobre la generación, propagación, control y detección de la luz en el rango infrarrojo, visible y ultravioleta, además de la interacción de la luz con la materia, diseño óptico, instrumentación óptica, láseres-aplicaciones y sensores ópticos han sido numerosos <sup>[5]</sup>, no se han realizado investigaciones orientadas a la miniaturización<sup>†</sup> de la instrumentación óptica y mucho menos de las prácticas de la enseñanza experimental.

Por otra parte, bajo el paradigma constructivista, los alumnos tienen la posibilidad de diseñar sus propios materiales <sup>[6]</sup> y equipos en su laboratorio de trabajo, propiciando con ello que el área de la enseñanza experimental sea un buen ejemplo para inducir al educando y crear conciencia del asunto ecológico. Además refuerza los conceptos teóricos de la materia, profundiza los conocimientos de la instrumentación óptica y pone en práctica su habilidad e imaginación.

<sup>†</sup> La palabra deriva del nombre que se le da a las pinturas de pequeñas dimensiones con las que se ilustraban y adornaban los antiguos manuscritos miniados medievales: miniaturas. El término procede del latín *minium* (minio), pigmento (óxido de plomo llamado cinabrio rojo) que se utilizaba antiguamente para marcar las letras iniciales del texto.

Adicionalmente del beneficio ecológico, las técnicas microanalíticas permiten obtener un beneficio económico por la reducción de costos que implica el uso de cantidades pequeñas de reactivos, la construcción de los instrumentos en el propio laboratorio y a que se prescinda de compañías para el mantenimiento y compostura de los equipos en caso de algún desperfecto, ya que estos problemas se arreglan en el mismo laboratorio.

La química a microescala ha demostrado gran utilidad en la práctica experimental docente, sobre todo en Química General y Química Sintética tanto orgánica como inorgánica<sup>[7]</sup>. Sin embargo en la enseñanza experimental de la Química Analítica las técnicas a microescala no se han desarrollado al mismo ritmo<sup>[8]</sup>. El incipiente desarrollo de éste ámbito en Química Analítica radica principalmente en que la instrumentación para el trabajo analítico con cantidades de muestras pequeñas (miligramos y microlitros) de aceptable exactitud y precisión, tiene altos costos de adquisición y mantenimiento<sup>[9]</sup> hecho que ha llevado a que su uso se restrinja al campo profesional o a la investigación formal<sup>[10]</sup>.

## **OBJETIVOS**

Es bajo estas premisas y para hacer a un lado los estigmas que por años ha tenido la Química a Microescala<sup>††</sup> que se establece como objetivo de trabajo diseñar, construir y caracterizar tres prototipos de microfotocolorímetros de mínima instrumentación (MIMC), para la cuantificación de analitos (en este trabajo: AAS en tabletas de aspirina y glucosa en suero sanguíneo humano) por medio de curvas de calibración con disoluciones estándar. Además, realizar las respectivas gráficas de Ringbom para determinar el intervalo de concentraciones de trabajo, las curvas ponderadas para demostrar la precisión y reproducibilidad de los resultados, y el análisis estadístico para demostrar que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los MIMC's y un espectrofotómetro convencional.

## **HIPÓTESIS**

Con materiales de bajo costo y de fácil adquisición se construye un Microfotocolorímetro de Mínima Instrumentación que proporciona resultados reproducibles, de aceptable precisión y comparables con los obtenidos en un espectrofotómetro convencional.

†† Por años, la química a microescala ha sido rechazada, porque popularmente se cree que los resultados obtenidos con estas técnicas son imprecisos, inexactos y poco reproducibles<sup>[11]</sup>.

## REFERENCIAS

- [1] Skoog, D. A *et al.* Principios de Análisis Instrumental. 5ta. Edición. Mc Graw-Hill. España, 1992. pp 122.
- [2] NOM-087-ECOL-1995.
- [3] NOM-001-SEMARNAT-1996.
- [4] NOM-002-SEMARNAT-1996.
- [5] <http://www.cinstrum.unam.mx>
- [6] J. Vargas, A. Baeza, T. Urzúa, J. Rodríguez y L. Cáceres. Titulaciones ácido-base a microescala química usando microsensores de pH y microelectrodo de referencia: adquisición de datos con nuevas tecnologías. *Revista Chilena de Educación Científica*. **2**, [2], 2004. pp 25-29.
- [7] Pike R. M., Szafran Z., Singh M. M., Mayo D. W. A. Major Revolution in the Chemistry Laboratory. **10**, [2], 1999. pp. 102 – 106.
- [8] A. Baeza. Microbureta a microescala total para titulometría. *Revista Chilena de Educación Científica*. **1**, [2], 2003. pp 4-7.
- [9] Maneiro R. M. ¿Porqué microescala? *Educación Química*. **8**, [3], 1997. pp. 166 – 167.
- [10] Villar M. C., Rodríguez M., Mirabal L. Adaptación de métodos de análisis a microescala para bebidas alcohólicas. *Educación Química*. **12**, [2], 2001. pp. 113 – 115.
- [11] ALEXÉIEV, V. N. Semimicroanálisis Químico Cualitativo. Editorial MIR MOSCÚ. pp 15.

---

## Principios de Fotocolorimetría

- Absorción de la energía radiante
  - Ley límite de Lambert-Beer-Bouger
    - Instrumentación óptica
- 

*Antes de empezar con el desarrollo del tema que nos ocupa haremos un breve compendio de los principios de la fotocolorimetría, empezando por describir como se lleva a cabo la interacción luz-materia pasando después a la deducción de la ecuación de Lambert-Beer-Bouger por el teorema de Green y finalmente, describiendo el esquema lineal de la instrumentación óptica, temas que nos servirán como apoyo para los capítulos y experimentos posteriores.*

### ABSORCIÓN DE LA ENERGÍA RADIANTE<sup>[1][2]</sup>

La fuerza neta que actúa sobre cualquier sistema puede expresarse como una función en términos de una expansión en serie:

$$F = m \frac{d^2x}{dt^2} = A_0 + A_1x + A_2x^2 + \dots \quad (1)$$

donde  $x$  representa el desplazamiento del sistema desde un punto arbitrario de origen (por ejemplo el centro de un átomo). De esta manera cualquier fuerza, por simple que sea, estará representada por un número infinito de términos de una expansión en serie (Ec. 1). Es posible en muchos casos en la naturaleza simplificar la ecuación (1) despreciando los términos superiores del polinomio. Si se selecciona un sistema de referencia adecuado puede considerarse el valor de  $A_0 = 0$  y si el desplazamiento provocado por la fuerza sobre el sistema es muy pequeño entonces la ecuación se simplifica a:

$$F = m \frac{d^2x}{dt^2} = A_1x \quad (2)$$

La relación entre la fuerza de restablecimiento de una masa oscilando en un resorte tiene la forma de la ecuación (2):

Si la constante  $A$ , es sustituida por una nueva constante,  $-k$ , entonces la ecuación (2) tiene la forma que representa la relación entre la fuerza de reestablecimiento de una masa oscilando en un resorte:

$$F = m \frac{d^2 x}{dt^2} = -kx \quad (3)$$

El comportamiento de dicha masa en un resorte puede usarse como modelo para estudiar la unión de un electrón a un átomo o molécula si esta unión es concebida como un resorte oscilante. La radiación electromagnética (ultravioleta, visible, rayos X, microondas, radiofrecuencias, etc.) actúa como una fuerza sobre el electrón moviéndolo a través del resorte (unión química), siendo esta interacción tan débil como para provocar desplazamientos muy grandes en la unión química.

La radiación electromagnética se representa como un campo eléctrico y otro magnético que están en fase, con oscilaciones sinusoidales en ángulo recto de uno con respecto a otro y respecto a la dirección de propagación (Fig. 1.1). El componente eléctrico es responsable de la mayoría de los fenómenos de absorción, transmisión, reflexión y refracción debido a que su interacción con la materia es más fuerte; y el componente magnético es el responsable de la absorción de las ondas de radiofrecuencia en la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

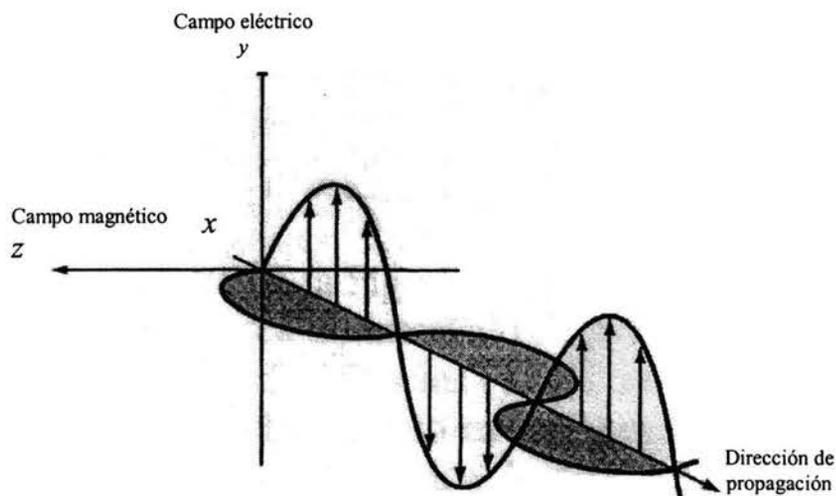


Fig. 1.1. Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano: campos eléctrico y magnético perpendiculares entre sí y respecto a la dirección de propagación.

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). La intensidad de una onda es la energía que fluye a través de una unidad de área

perpendicular a la dirección de propagación. La intensidad es proporcional al cuadrado de la amplitud de onda.

Dado que la interacción del componente magnético de una onda electromagnética con la materia es más débil que la interacción con el componente eléctrico, sólo se considera éste para el tratamiento siguiente:

Con la ecuación de la frecuencia angular de una onda,  $\omega$ , (Ec. 4) es posible expresar la magnitud del campo eléctrico de una onda monocromática electromagnética en función del tiempo en un punto dado (arbitrario) en el espacio (Ec. 5):

$$\omega = 2\pi\nu \quad (4)$$

$$E = E_0 \cos(\omega t) \quad \text{a } y = 0 \quad (5)$$

donde  $E_0$  es la amplitud de la onda. La ecuación (5) puede expresarse en términos del tiempo que tarda la onda en recorrer una distancia  $y$  a partir de  $y = 0$  por medio de su velocidad  $c$ :

$$E = E_0 \cos\left[\omega\left(t - \frac{y}{c}\right)\right] \quad (6)$$

$E$  tiene el mismo valor para  $t = 0, y = 0$  así como para  $t = \frac{y}{c}$  para  $y = y$ .

Como ya se mencionó, la ecuación que describe el movimiento de una masa,  $m$ , suspendida de un resorte de coeficiente de elasticidad,  $k$ , en ausencia de cualquier fuerza externa retardatriz o directriz esta expresada por la ecuación (3):

$$\text{Fuerza restauradora} = F = -kx$$

ó

$$m\left[\frac{d^2x}{dt^2}\right] + kx = 0 \quad (7)$$

La resolución de la ecuación diferencial (7) esta dada por:

$$x = x_0 \cos(\omega_0 t) \quad (8)$$

donde

$$\omega_0 = \sqrt{\left(\frac{k}{m}\right)} = \text{frecuencia natural de una masa suspendida en un resorte} \quad (9)$$

para un desplazamiento inicial máximo,  $x = x_0$  en un tiempo,  $t = 0$ . Ya que no hay fuerza de fricción retardatriz la posición del resorte obedece a un movimiento oscilante sinusoidal de manera indefinida a la frecuencia natural,  $\nu_0 = (\omega_0 / 2\pi)$  ciclos por cada segundo.

El fenómeno de absorción de la luz es similar a establecer de manera permanente y con una frecuencia dada una fuerza directriz sobre la masa suspendida en el resorte (Fig. 1.2):

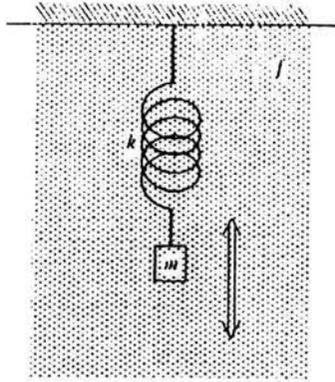


Fig. 1.2. El cuerpo tiene una masa,  $m$ , unida a un resorte de fuerza constante,  $k$ , inmerso en un medio que provoca un coeficiente de fricción,  $f$ , y sujeto a un desplazamiento súbito o a una fuerza sinusoidal que se aplica durante un tiempo y a una frecuencia dados.

la fuerza,  $F$ , puede ser la misma que  $\nu_0$  del resorte o bien puede ser también de diferente valor. Es importante que la fuerza ejercida sobre  $m$  establezca un estado permanente de movimiento del sistema (steady state). En tales circunstancias la amplitud del movimiento se vuelve una función de la frecuencia de la fuerza directriz ejercida.

Si se considera 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 (una onda de luz, por ejemplo) es el de 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 en ("scattered light").

Si la frecuencia de la radiación electromagnética incidente es de igual frecuencia que  $\nu_0$  se presenta un fenómeno de resonancia y se esperaría que el *resorte* absorbiera energía progresivamente y cada vez presentar un movimiento de mayor amplitud sin límites. Sin embargo cualquier resorte en la realidad (incluyendo, por su puesto, a los electrones unidos a una molécula) es inhibido en su movimiento por fuerzas de fricción, expresadas como *fuerzas de amortiguamiento* proporcionales a la velocidad de la masa que se esta moviendo (el electrón):

$$\text{fuerza de amortiguamiento} = f \left( \frac{dx}{dt} \right)$$

Si la fuerza directriz aplicada en estado estacionario es  $F_0 = \cos(\omega t)$  y el sistema esta amortiguado, la fuerza neta sobre la masa que se desplaza una distancia  $x$  es:

$$m \left( \frac{d^2 x}{dt^2} \right) = \text{fuerza neta} = -kx - f \left( \frac{dx}{dt} \right) + F_0 \cos(\omega t) \quad (10)$$

Aquí  $-kx$  es la fuerza de restablecimiento del resorte,  $-f(dx/dt)$  es la fuerza de fricción que se opone al movimiento, y  $F_0 \cos(\omega t)$  es la fuerza directriz aplicada. Utilizando la ecuación (9),  $\omega_0 = (k/m)$ , la ecuación (10) queda simplificada de la manera siguiente:

$$x = x' \cos(\omega t) + x'' \sin(\omega t)$$

donde

$$x' = F_0 \frac{m(\omega_0^2 - \omega^2)}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + f^2 \omega^2} \quad (11)$$

y

$$x'' = F_0 \frac{f \omega}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + f^2 \omega^2}$$

La ecuación (11) muestra que el desplazamiento de la masa en estado estacionario,  $x$ , puede descomponerse en dos componentes,  $x' \cos(\omega t)$  y  $x'' \sin(\omega t)$  que pueden interpretarse como las partes de la respuesta del sistema ya sea exactamente en fase con la fuerza directriz incidente  $[\cos(\omega t)]$  o exactamente  $90^\circ$  fuera de fase  $[\sin(\omega t)]$ .

De los dos componentes mencionados arriba la que ocurre  $90^\circ$  fuera de fase es la que esta relacionada directamente con la absorción. La siguiente figura ilustra este hecho:

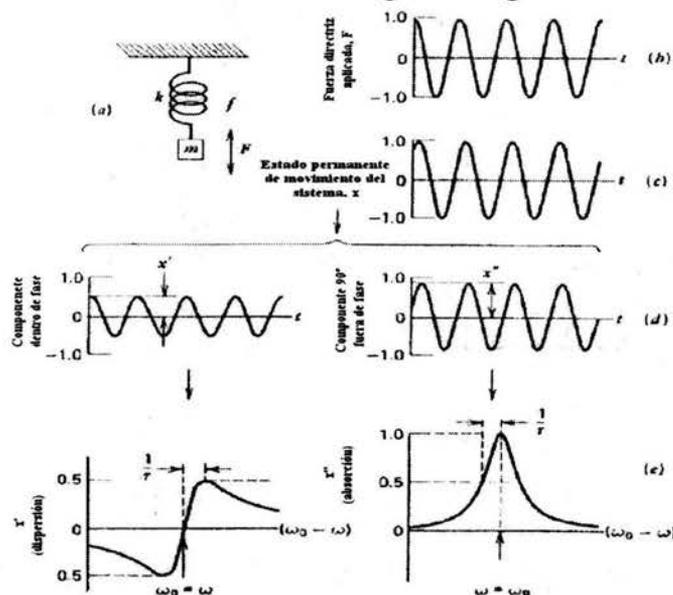


Fig. 1.3. Descomposición del desplazamiento de la masa en estado estacionario en dos componentes.

Cuando la frecuencia incidente es muy cercana a la frecuencia natural del sistema, es decir, en la vecindad de una línea de absorción, la ecuación (11) se reduce a un simple límite:

$$\text{Si } |\varpi_0 - \varpi| \ll (\varpi_0 + \varpi)$$

entonces podemos hacer una aproximación de  $\varpi \cong \varpi_0$  para dar:

$$(\varpi_0^2 - \varpi^2) = (\varpi_0 - \varpi)(\varpi_0 + \varpi) \cong 2\varpi_0(\varpi_0 - \varpi)$$

$$\text{Absorción} = \lim_{\frac{\omega_0 - \omega}{\omega_0 + \omega} \ll 1} (x'') = \frac{F_0}{2m\omega_0} \left[ \frac{\tau}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 \tau^2} \right] \quad (17)$$

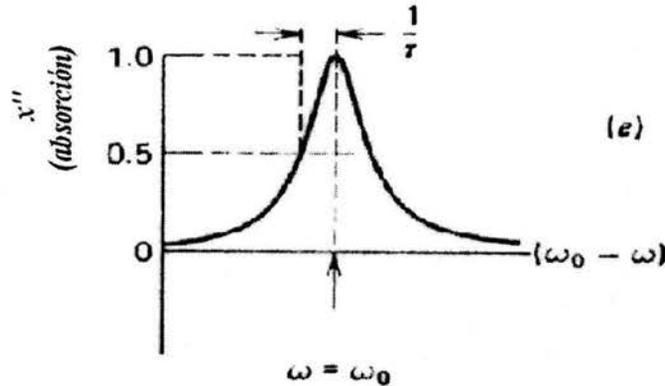


Fig. 1.5. Representación de la función de absorción

En efecto, la ecuación (17) proporciona las curvas típicas de los espectros de absorción de las moléculas.

### LEY LÍMITE DE LAMBERT-BEER-BOUGER

Al hacer incidir un haz de luz monocromática de intensidad incidente  $I_0$  a través de una disolución que contiene un *i*-ésimo analito de concentración  $[i]$ , durante 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  $l$ , y dicha función tiene la forma de una diferencial total <sup>[3]</sup>:

$$dI = \left( \frac{\partial I}{\partial l} \right) dl + \left( \frac{\partial I}{\partial [i]} \right) d[i] \quad \text{para } [I] = \Phi_1 C_0 \dots \dots \dots (18)$$

De acuerdo a la ley de Lambert:

$$\left( \frac{\partial I}{\partial l} \right) = -k_l I$$

y de acuerdo a la ley de Beer y de Bouger:

$$\left( \frac{\partial I}{\partial [i]} \right) = -k_{[i]} I$$

Sustituyendo las respectivas proporcionalidades de Lambert-Beer-Bouger en la ecuación diferencial (18), y multiplicando por -1 ambos miembros de la ecuación:

$$-dI = -k_l I dl + -k_{[i]} I d[i] \dots \dots \dots (19)$$

Dividiendo la ecuación (19) entre I se obtiene:

$$\frac{-dI}{I} = k_l dl + k_{[i]} d[i] \dots \dots \dots (20)$$

La ecuación (20) se integra desde  $l = 0$ ,  $[i] = 0$  cuando  $I = I_0$ , hasta  $l = l$  e  $[i] = [i]$  cuando  $I = I$ :

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_{(0,0)}^{(i,l)} k_l dl + k_{[i]} d[i] \dots \dots \dots (21)$$

El término de la derecha de la ecuación 21 es una integral que de acuerdo al **teorema de Green** [4] se reduce a:

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_0^l \int_0^{[i]} \left( \frac{dk_l}{d[i]} - \frac{dk_{[i]}}{dl} \right) dld[i] \dots \dots \dots (22)$$

Si  $k_l$  y  $k_{[i]}$  son funciones lineales de  $[i]$  y de  $l$ , respectivamente, la ecuación anterior se convierte en:

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_0^l \int_0^{[i]} (k_1 - k_2) dld[i] \dots \dots \dots (23)$$

donde  $k_1$  y  $k_2$  son constantes definidas por  $dk_l/d[i]$  y  $dk_{[i]}/dl$  respectivamente.

Resolviendo la integral y reorganizando  $(k_1 - k_2) = K$ , se obtiene la conocida ley de Lambert-Beer-Bouger:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -KI[i] \dots \dots \dots (24)$$

Ahora bien, la relación  $I/I_0$  se puede determinar experimentalmente si se mide la respuesta de un detector sensible a la luz. Los fotodetectores usados en fotocolorimetría proporcionan una respuesta en forma de diferencia de potencial eléctrico que puede medirse con un voltímetro. Se busca que el detector responda de acuerdo a la siguiente ecuación [5]:

$$R = R_r + kI; \quad I_u < I < I_{sat}$$

donde  $R_r$  es la respuesta residual, es decir, la respuesta del detector a la poca luz que se filtra conocida como 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 se caracteriza porque  $(dR/dI) = 0$ .

El detector ideal para fotocolorimetría y espectrofotometría es aquel que presente las siguientes características:  $R_r = 0$ ,  $I_0 = 0$ ,  $I_{sat} \rightarrow \infty$  y  $k \rightarrow \infty$ .

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

Para el blanco:

$$I_0 = \frac{R_0 - R_r}{k} \dots\dots\dots(25)$$

para la disolución de analito absorbente:

$$I_i = \frac{R_i - R_r}{k} \dots\dots\dots(26)$$

entonces es posible determinar el parámetro adimensional T, conocido como transmitancia, por medio de la medición de la respuesta R del detector, de la siguiente manera:

$$T = \frac{I_i}{I_0} = \frac{R_i - R_r}{R_0 - R_r} \dots\dots\dots(27)$$

Con esta última ecuación se puede calcular un segundo parámetro adimensional conocido como *absorbancia* [6]:

$$A = -\log T = pT = -\log\left(\frac{R_i - R_r}{R_0 - R_r}\right) \dots\dots\dots(28)$$

## INSTRUMENTACIÓN ÓPTICA [7][2]

En realidad, el esquema lineal de instrumentación óptica, especialmente para el análisis en la región visible, no es muy complicado, al contrario, es un sistema muy sencillo (Fig. 1.6); consta de una fuente de radiación, sistema dispersor, la celda o recipiente que contiene la disolución estándar o muestra, un fotodetector transductor, un amplificador, un registrador de datos y finalmente un procesador de datos. Actualmente existen una gran cantidad de compañías que fabrican espectrofotómetros los cuales llegan a ser muy elaborados y complicados en su sistema. Esta complejidad radica principalmente en el sistema dispersor del cual depende la calidad del espectrofotómetro y en consecuencia su costo.

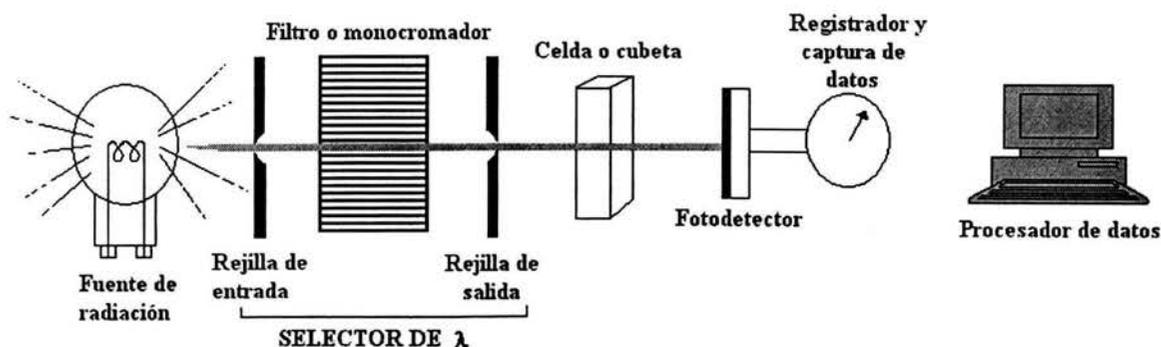


Fig. 1.6. Esquema lineal de la instrumentación óptica.

## **Fuentes de radiación.**

La fuente ideal es aquella que proporciona una radiación constante y uniforme sobre una amplia región espectral. Existe una amplia gama de lámparas que se utilizan para el análisis por métodos ópticos.

Para la región visible se utilizan: lámparas de Xenón o Tungsteno encapsulado en vidrio, siendo más utilizado el segundo por su accesible costo. El tungsteno (W) emite una temperatura de 2600 a 3000 K y es útil en una región de longitudes de onda que va de 0.35 a 2.5  $\mu\text{m}$ .

En la región ultravioleta se utilizan:

- La lámpara de deuterio.
- Lámpara de mercurio.
- Lámpara de argón con recubrimiento de LiF y que es útil en una región de longitudes de onda que van de 0.107 a 0.165  $\mu\text{m}$ .
- Lámpara de hidrógeno encapsulado en cuarzo y útil en una región de longitudes de onda que van de 0.18 a 0.38  $\mu\text{m}$ .

### *Problemas más frecuentes:*

Los posibles problemas que se pueden presentar en la fuente de radiación son dos, principalmente. La primera es que la lámpara emita una baja radiación con respecto a la potencia normal, la causa puede estar en el desgaste de la lámpara debido al uso o a que el voltaje proporcionado sea inferior al que utiliza la lámpara para emitir una intensidad adecuada. La primera se resuelve cambiando la lámpara, y para resolver la segunda es necesaria la utilización de un transformador de voltaje constante.

La segunda causa, y la más frecuente, es la variación del voltaje en la línea de toma de corriente provocando una variación en la intensidad de la radiación emitida. Estas variaciones se eliminan utilizando dispositivos electrónicos que “amortiguan” los cambios en las líneas de voltaje (Reguladores de voltaje).

## **Selectores de longitud de onda**

Para la mayoría de los análisis espectroscópicos, se necesita una radiación constituida por un grupo limitado, estrecho y continuo de longitudes de onda denominado *banda*. Un ancho de banda estrecho aumenta la sensibilidad de las medidas de absorbancia, puede proporcionar selectividad tanto a los métodos de absorción como a los de emisión y, con frecuencia, es un requisito para obtener una relación lineal entre la señal óptica y la concentración (ecuación de Lambert-Beer-Bouger). Existen dos clases de selectores de longitud de onda, los filtros y los monocromadores.

### *Filtros.*

Por definición, la función de un filtro es transmitir una banda de radiación en particular y la absorción de todas las demás. Se emplean dos tipos de filtros para la selección de la

longitud de onda: los filtros de interferencia denominados también filtros de Fabry-Perot que operan en la región ultravioleta, visible y buena parte del infrarrojo y los filtros de absorción que se limitan a la región visible del espectro electromagnético.

Los filtros de interferencia están conformados por un dieléctrico transparente que ocupa el espacio entre dos películas metálicas semitransparentes. Esta disposición se coloca entre dos placas de vidrio u otro material transparente (Fig. 1.7a). Su mecanismo de funcionamiento se fundamenta en las interferencias ópticas para producir bandas estrechas de radiación. La longitud de onda transmitida depende totalmente del espesor de la capa dieléctrica.

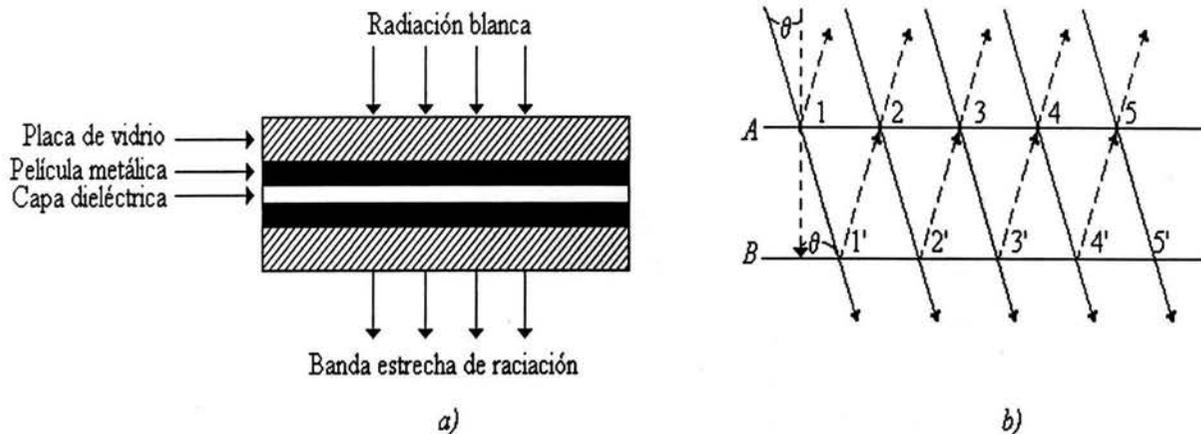


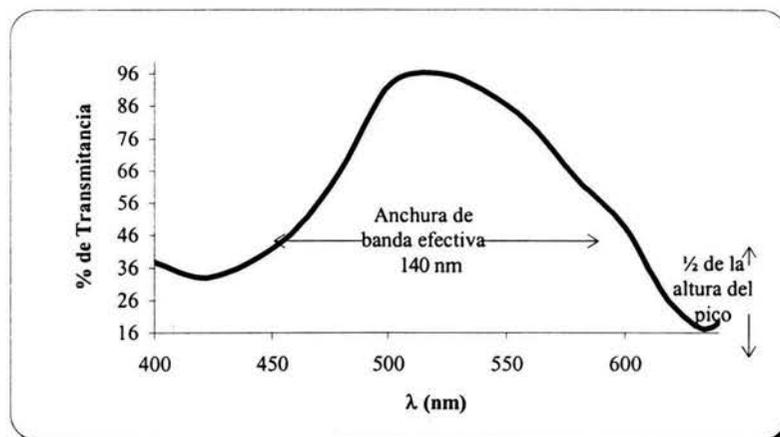
Fig. 1.7. a) Esquema de un filtro de interferencia. b) Generación de una interferencia constructiva.

De esta manera, cuando radiación blanca incide sobre la primera placa metálica una fracción de esta logra atravesarla mientras que el resto es reflejada, posteriormente esta fracción choca con la segunda placa metálica sufriendo una segunda partición. En esta segunda partición puede que se refleje la longitud de onda deseada, pero sucede en un ángulo tal que al chocar nuevamente con la primera placa metálica se refleja en fase con la luz incidente de la misma longitud de onda. De esta forma se refuerza la longitud de onda deseada. Las demás longitudes de onda son reflejadas en un ángulo diferente que no pueden atravesar la segunda placa metálica y se dice que sufren una interferencia destructiva (Fig. 1.7b).

Otro tipo de filtros de interferencia son los llamados cuñas de interferencia constituidos básicamente de un par de placas parcialmente transparentes, especulares, separados por una capa de un material dieléctrico en forma de cuña. La radiación transmitida varía en longitud de onda continuamente de un extremo a otro a medida que lo hace el espesor de la cuña. Si se escoge la posición lineal adecuada a lo largo de la cuña, se puede aislar un ancho de banda de unos 20 nm.

Los filtros de absorción consisten en placas de vidrio coloreadas, en suspensiones de colorantes en gelatina que se coloca entre dos placas de vidrio o bien, en disoluciones de compuestos coloridos contenidos en un recipiente semejante o igual a las celdas de absorción. Estos filtros basan su funcionamiento en la absorción de radiación en ciertas partes de la región del visible, aislando ciertas longitudes de onda, las cuales corresponden a las longitudes de onda máximas de absorción del analito en cuestión. Estos filtros son

mucho más baratos que los filtros de interferencia pero presentan anchos de banda efectivos mucho mayores, oscilando entre 30 y 250 nm (Fig. 1.8). Esta situación puede mejorarse combinando dos o más filtros, aunque, si con un solo filtro se llega a absorber parte de la radiación deseada provocando con ello una disminución en la transmitancia de la longitud de onda elegida, al hacer este tipo de combinaciones se incrementa aún más. Pero a pesar de estas deficiencias tienen muchas aplicaciones exitosas.



**Fig. 1.8.** Zona de longitudes de onda efectivas aisladas por un filtro de absorción que consiste en un colorante verde artificial. Utilizado para aislar longitudes de onda de absorción máximas de analitos cuyas disoluciones son rojas (color complementario del verde)

### Monocromadores.

Los monocromadores son dispositivos que producen un haz de radiación de alta pureza espectral con un ancho de banda muy angosto, cuya longitud de onda se puede variar de forma continua y en un amplio intervalo; es decir, permite realizar un barrido espectral.

Los componentes comunes de los monocromadores son:

- Rendija de entrada: proporciona una imagen óptica rectangular; y junto con el elemento dispersor determinan el ancho de banda, esto porque al reducir la rendija, decrece la intensidad del haz de radiación y al mismo tiempo, hace más angosta su amplitud de banda. Puede lograrse una mayor resolución en las mediciones de absorción, mediante bandas más angostas, aunque esto viene acompañado de una disminución notable de la potencia radiante disponible, dificultándose la medida exacta de dicha potencia .
- Colimador (Lente o espejo): Produce un haz paralelo de radiación.
- Elemento dispersor (prisma o rejilla): Como su nombre lo indica, dispersa la radiación en longitudes de onda individuales:

- **Prismas:** Están hechos de diferentes materiales dependiendo la región del espectro en donde se quieran utilizar, los más frecuentes son el vidrio y el cuarzo. Los prismas más utilizados son los de 60 ° y el de 30° (Fig. 1.9). El primero puede fabricarse de una sola pieza de material, o bien utilizando dos bloques de cuarzo (uno leve y otro dextro) de 30° cada uno, a este último se le conoce con el nombre de *prisma de Cornu*. Los prismas de

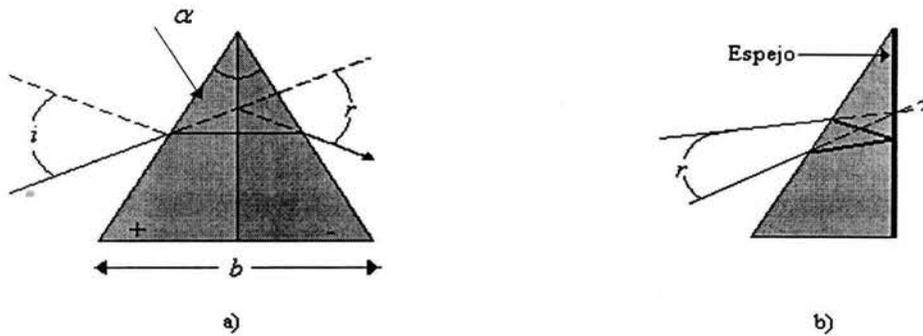


Fig. 1.9. Dispersión prismática: a) por un prisma de Cornu y b) un prisma de Littrow.

- **Rejillas de difracción:** También son llamadas redes y consisten en una superficie dura, pulida y óptimamente plana sobre la que se han grabado, con una herramienta de diamante afilada adecuadamente, un gran número de surcos paralelos y muy próximos entre sí. La superficie se hace reflectante mediante un recubrimiento de aluminio, o, algunas veces, de oro o platino. Una rejilla para la región ultravioleta y visible normalmente tiene de 300 a 2,000 surcos/mm siendo los más habituales los de 1,200 a 1,400 surcos/mm.

Hay varios tipos de rejillas entre las que se encuentran la de escalera o escalerilla, las cóncavas y las holográficas (Fig. 1.10). Las primeras son fabricadas haciendo estrías o surcos de forma que adquiere una geometría de una escalera con caras relativamente anchas en las que se produce la reflexión, y caras estrechas no utilizadas. Las rejillas cóncavas son similares, la única diferencia es que se trata de una superficie cóncava, lo que le da ciertas ventajas como prescindir del uso de espejos y lentes colimadores y focalizadores, ya que este tipo de superficie tiene la doble función de dispersar y focalizar la radiación en la rejilla de salida. El último tipo es más reciente y se trata de una red construida en una superficie de vidrio recubierto con un material fotosensible, sobre el cual se hace incidir, con un ángulo apropiado, los rayos de un par de láseres idénticos, lo que provoca la sensibilización del material fotosensible disolviéndola, dejando con ello una estructura de surcos que puede recubrirse con aluminio u otra sustancia reflectante para obtener una red de reflexión; estas rejillas holográficas producen espectros con menos radiación parásita y fantasma (dobles imágenes).

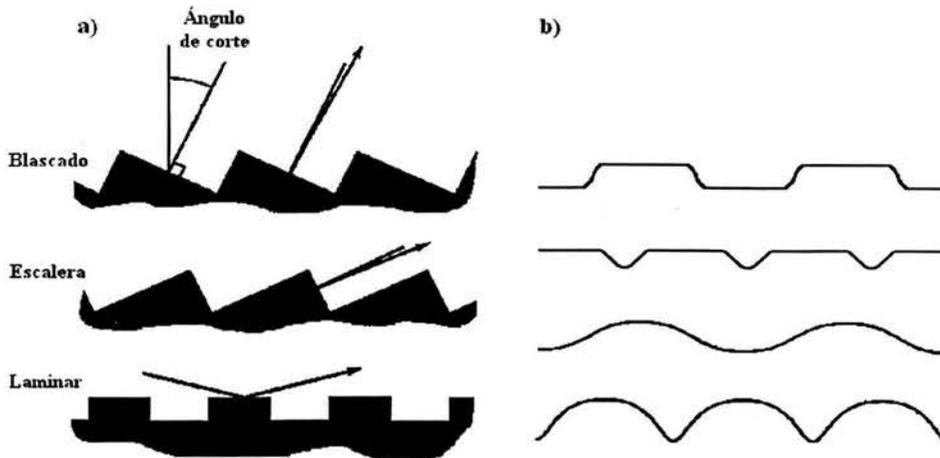


Fig. 1.10. a) Superficie grabada con un instrumento de diamante. b) Superficie con grabado holográfico.

- d) Elemento de enfoque (lente o espejo): Forma nuevamente la imagen de la rendija de entrada y la enfoca en una superficie plana denominada plano focal.
- e) Rendija de salida: Aísla la banda espectral deseada.

*Problemas más frecuentes:*

En el sistema dispersivo se presenta un problema principalmente: la falta de monocromación, es decir, la señal de salida del selector de longitud de onda tiene un ancho de banda ( $\Delta\lambda$ ) grande. Así, cuando un haz de luz de una intensidad inicial, longitud de onda dada ( $I_0\lambda$ ) y con un  $\Delta\lambda$  grande, incide sobre una muestra de determinada concentración ( $C_0$ ), la intensidad que emerge de la muestra estará acompañada de otras longitudes de onda no absorbidas que en conjunto llegarán al detector (Fig. 1.11). A medida que el ancho de banda se incrementa, la función  $A = f(C)$  se irá alejando de la linealidad. Veamos:

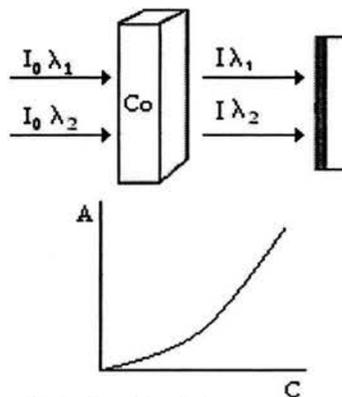


Fig. 1.11. Esquema del comportamiento de un haz de luz no monocromático y su efecto en la respuesta.

En el sistema de la Fig. 1.11 T está dado por:

$$T' = \frac{I\lambda_1 + I\lambda_2}{I_0\lambda_1 + I_0\lambda_2} \dots\dots (29)$$

Para  $\lambda_i$ -ésima se cumple esta relación:

$$T_i = \frac{I_i}{I_{0i}} = 10^{-\epsilon_i l C} \dots\dots (30)$$

$$I_i = I_{0i} 10^{-\epsilon_i l C} \dots\dots (31)$$

Sustituyendo 3 en 1:

$$T' = \frac{I_0\lambda_1 10^{-\epsilon_{\lambda_1} l C} + I_0\lambda_2 10^{-\epsilon_{\lambda_2} l C}}{I_0\lambda_1 + I_0\lambda_2} \dots\dots (32)$$

Determinando el pT ó Absorbancia a la ecuación 4:

$$-\log T' = pT = A = -\log \left[ \frac{I_0 \lambda_1 10^{-\varepsilon_{\lambda_1} l C} + I_0 \lambda_2 10^{-\varepsilon_{\lambda_2} l C}}{I_0 \lambda_1 + I_0 \lambda_2} \right] \dots\dots (33)$$

Es evidente que en la ecuación (33) la relación  $pT = f(C)$  no es lineal, y la gráfica resultante es como la que se esquematiza en la Fig. 1.11.

Es por tal razón que las determinaciones de absorción se llevan a cabo a la longitud de onda máxima de absorción del analito. De esta manera se reduce al mínimo la interferencia del ancho de banda sobre la proporcionalidad de la respuesta con respecto a la concentración (Fig. 1.12).

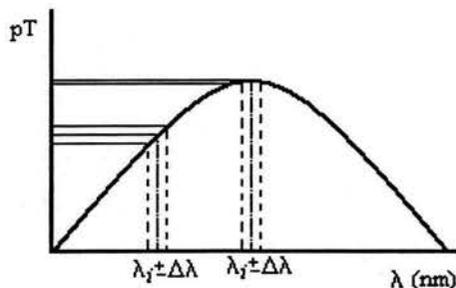


Fig. 1.12. Efecto del máximo de absorción del analito y el ancho de banda sobre la dispersión de la respuesta obtenida.

Es entonces en el sistema dispersivo donde radica la calidad y, en consecuencia, el costo de los espectrofotómetros. Las compañías dedicadas a la fabricación de estos equipos orientan sus esfuerzos a reducir el  $\Delta\lambda$ .

### Celdas de absorción.

Las celdas de absorción tienen la función de contener a la disolución estándar o de muestra a la cual se le va a determinar su absorbancia. Los materiales utilizados para la fabricación de las celdas deben de ser transparentes en la región del espectro electromagnético en la que se pretenda utilizar, y será inapropiado cuando su absorbancia sea mayor de 0.2 (Fig. 1.13). Para ello se debe de determinar la transparencia del material tomando en cuenta las pérdidas por reflexión que aumentan al incrementarse el índice de refracción y varían con el ángulo de incidencia. El promedio de pérdidas por incidencias normales para estos materiales es de aproximadamente 10 %.

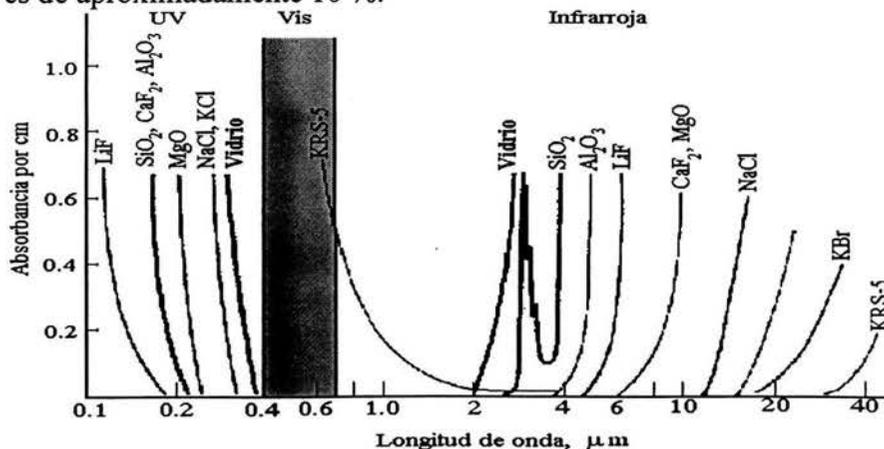


Fig. 1.13. Curvas de absorción de diferentes materiales ópticos (Tomados en parte de 10).

El vidrio se usa principalmente en la región visible, es un material óptico que transmite longitudes de onda que van de 350 a 3000 nm. Actualmente se usan celdas de plástico para esta región; esta práctica se lleva a cabo principalmente en los laboratorios de análisis clínicos en donde se necesitan muchas celdas para las múltiples determinaciones que realizan; estas celdas ofrecen la ventaja de ser muy baratas y desechables. Prácticamente todos los materiales pueden ser utilizados en esta región excepto el KRS-5 (ver Fig. 1.13) que además es muy caro.

La fluorita, que transmite longitudes de onda en un intervalo que va de 125 a 8500 nm, y el cuarzo, que transmite en un intervalo de longitudes de onda de 180 a 3500, son muy efectivos para la región del ultravioleta.

Para la región del infrarrojo son muy utilizadas las sales metálicas de los elementos alcalinos y alcalinotérreos.

#### *Problemas más frecuentes:*

Los fenómenos de reflexión representan el problema más común en las celdas de absorción. Esta pérdida de luz sucede al reflejarse la radiación al incidir sobre el material con el que esta construida la celda y es aún mayor cuando, por el uso, tienen ralladuras en la superficie o están sucias (Fig. 1.14). Es por eso que hay que tener mucho cuidado con ellas al manejarlas en el laboratorio.

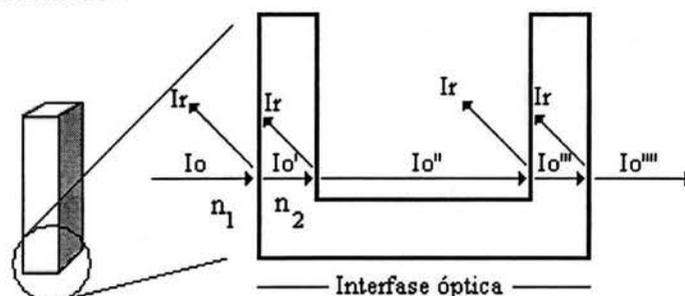


Fig. 1.14. Fenómenos de reflexión de la radiación por la celda de absorción.  $I_0$  es la intensidad luminosa inicial e  $I_r$  es la fracción de  $I_0$  reflejada

Los posibles errores en la respuesta por este fenómeno se minimizan cuando se usa la misma celda para todas las disoluciones involucradas en el análisis y cuando se ajusta el aparato con el blanco o medio de reacción.

#### **Fotodetectores.**

Sin duda alguna el ojo humano fue el primer fotodetector utilizado en las técnicas opticométricas, pero tiene una gran deficiencia, no es muy sensible a los cambios pequeños de concentración y presenta mucha imprecisión. Además, existe una gran variabilidad en el resultado dependiendo de la persona que esté ejecutando el análisis. Posteriormente el papel fotográfico se utilizó como fotodetector, pero el largo tiempo que se requería para revelar la placa fotográfica hizo que se reemplazara por otro tipo de fotodetectores. Es aquí donde se hizo necesario el desarrollo de nuevos detectores ópticos que fueran más eficaces y eficientes. Enseguida se enumeran algunos de los más usados.

- Celda fotovoltaica o autogeneradora: Se trata de una capa delgada de un material fotosensible como el óxido cuproso depositada sobre una capa metálica de cobre, o de selenio depositada sobre una capa metálica hierro (Fig. 1.15). Cuando se expone a la luz, los electrones fluyen del semiconductor hacia el metal generando una corriente o una fuerza electromotriz. Estas respuestas o salidas son registradas en un microamperímetro o en un galvanómetro resistente. Se usa principalmente en la región del visible y en niveles de iluminación como los fotómetros de filtro. Se obtienen salidas lineales proporcionales a la intensidad hasta niveles moderados de iluminación.

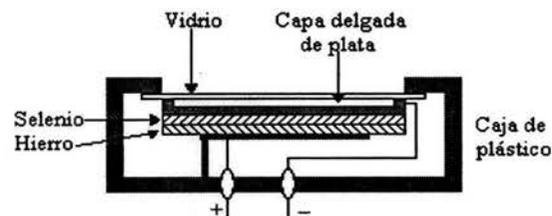


Fig. 1.15. Esquema de una típica celda fotovoltaica de selenio depositado sobre hierro.

- Fototubo al vacío: Consiste en un tubo al vacío en cuyo interior hay un cátodo de metal en forma de un medio cilindro que tiene su superficie interna recubierta con una capa de metal alcalino o un óxido alcalinotérreo, y un ánodo que es un alambre colocado a lo largo del eje del cilindro (Fig. 1.16). Al exponer el fototubo a la radiación, los electrones son lanzados al cátodo y se mueven hacia el alambre anódico positivo, formando así una corriente. Todos los electrones son recolectados, manteniendo el ánodo en aproximadamente + 90V en relación con el cátodo y se logra una operación estable. La salida se registra en un amperímetro. Se usa tanto en la región visible como la ultravioleta.

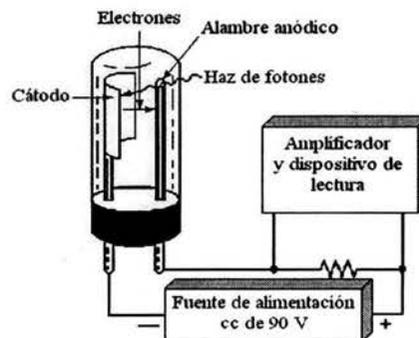


Fig. 1.16. Fototubo típico. La radiación produce una corriente que genera una caída de potencial que es enviada al registrador.

- Fototubo electrónico: Esta conformado de varias etapas de amplificación dentro del recubrimiento del tubo, utilizando una serie de ánodos y una emisión controlada de electrones secundarios. El tubo contiene también unos electrodos adicionales denominados dínodos. El dínodo 1 se mantiene a un potencial de 90 V más positivo que el del cátodo y por tanto los electrones se aceleran hacia él. Al incidir sobre el dínodo, cada fotoelectrón origina la emisión de varios electrones adicionales; éstos a su vez son acelerados hacia el dínodo 2, el cual esta a 90 V más positivo que el dínodo 1. De nuevo, por cada electrón que incide sobre la superficie se emiten varios electrones (Fig. 1.17). Después de repetirse este proceso nueve veces, se han originado de  $10^6$  a  $10^7$  electrones

por cada fotón incidente. Su arreglo permite que el número de fotoelectrones se multiplique directamente por un factor tan elevado como  $10^8$ . Al final se produce una corriente que se mide con un amperímetro.

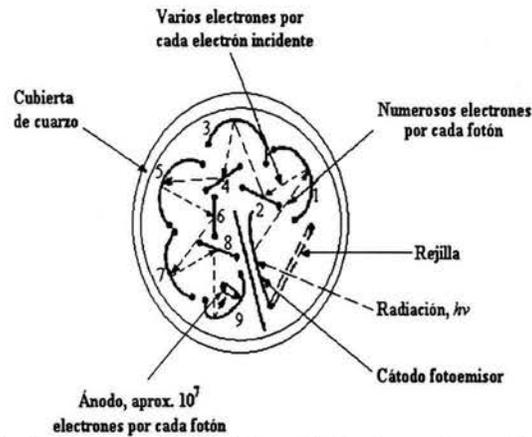


Fig. 1.17. Fototubo electrónico, llamado también fototubo multiplicador por la amplificación que hace de los fotones incidentes iniciales. Vista transversal.

Los fototubos se usan sólo para potencias radiantes pequeñas; aun en niveles moderados de iluminación pueden causar cambios irreversibles o cuando menos, lentamente reversibles en la salida. Como resultado, estos tubos se mantienen siempre en lugares cerrados a la luz, con un obturador para controlar el orificio de entrada. Apropiado para la región del ultravioleta y del visible.

*Problemas más frecuentes:*

La luz que se filtra al sistema, conocida como luz parásita, constituye el principal problema en el fotodetector. Esta radiación exterior no forma parte de la luz monocromática e incide junto con ésta sobre el detector contribuyendo a la respuesta generada.

**Registrador.**

Son dispositivos electrónicos que, amplificando o no la señal eléctrica del detector, transforman la señal, por medio de circuitos electrónicos, en una lectura. Ejemplos típicos son los microamperímetros, amperímetros, galvanómetros y óhmetros. Cada uno es utilizando según la señal que se genere en el detector; así, si la señal es una corriente el microamperímetro o el amperímetro se utilizan como registradores, si es una diferencia de potencial se utiliza un galvanómetro y si es una resistencia se utiliza un óhmetro.

**Procesador.**

Finalmente el procesador es aquel que transformará los datos obtenidos en el registrador generalmente en una gráfica (espectro de absorción, curva de calibración, cromatograma, etc.). Para este fin el procesador puede ser un papel milimétrico, una calculadora o un sistema más complicado como la computadora

## REFERENCIAS DE CAPITULO

- [1] Marshall, Allan G. Biophysical Chemistry. Principles, techniques, and applications. John Wiley & Sons. Chapter 13 and 14. 1978.
- [2] Skoog, Douglas A. *et al.* Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición. Mc Graw-Hill. España, 1992. Capítulo 6.
- [3] Lohman, F. H. The mathematical combination of Lambert's Law and Beer's Law. *Journal of Chemical Education*, **32** (1955) 155.
- [4] Swokowski, Earl W. Cálculo con geometría analítica. Grupo Editorial Iberoamérica. 1982. pp 953.
- [5] Reilley C. and Crawford C. M. Principles of precision colorimetry. A general approach to photoelectric spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, **27** (1955) 716.
- [6] Spectrometry nomenclature. *Analytical Chemistry*, **46** (1974) 2257.
- [7] Strobel, H. A. Instrumentación Química. Estudio sistemático del análisis instrumental. Editorial Limusa Wiley, S. A. México, 1968. Capítulo 7.

---

## Determinaciones Propuestas

- Determinación cuantitativa de glucosa en suero sanguíneo
  - Determinación cuantitativa de AAS en tabletas de Aspirina®
- 

*Uno de los pasos importantes para proponer un nuevo método es someterlo a pruebas para demostrar su funcionamiento. En el caso de los microfotocolorímetros se proponen dos pruebas: la primera es una determinación farmacéutica y la segunda una determinación clínica. En este capítulo se describe someramente la utilidad y el fundamento de la técnica.*

### **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA EN SUERO SANGUÍNEO**

La glucosa es la mayor fuente de energía para los procesos de la vida. Cuando se oxida por las vías glucolíticas y del ácido cítrico da lugar a la biosíntesis del adenosín trifosfato ("ATP") que constituye la fuente de energía universal para las reacciones biológicas <sup>[1]</sup>.

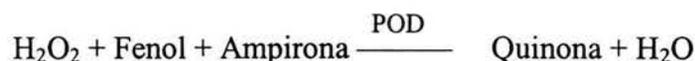
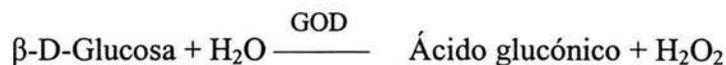
La concentración de glucosa en sangre es regulada por hormonas que afectan a una o más de las vías metabólicas, por ejemplo: la insulina hace descender sus niveles sanguíneos, mientras otras hormonas contrarreguladoras como el glucagon, la adrenalina, el cortisol y la hormona de crecimiento los elevan <sup>[2]</sup>.

La insulina es un péptido pequeño que secretan las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. Aumenta la permeabilidad de las membranas a la glucosa, se enlaza con receptores en las superficies celulares, y mejora así el grado de entrada del monosacárido a los tejidos hepáticos, musculares y adiposos. También altera las vías metabólicas de éste carbohidrato y favorece la formación de glucógeno, grasas y proteínas <sup>[2]</sup>.

La *diabetes mellitus* es resultado de una anormal regulación hormonal, principalmente de la insulina, y de los procesos metabólicos de la glucosa, manifestándose por la presentación de hiperglucemia. Esta enfermedad constituye la tercera causa de muerte en México, principalmente entre la población que tiene de 45 a 64 años de edad <sup>[3]</sup>. Es entonces que se hace necesario el monitoreo de la concentración de glucosa en sangre y se convierte en una

de las pruebas más realizadas en los laboratorios de análisis clínicos para establecer tratamientos profilácticos, terapéuticos o rehabilitatorios.

El método químico más utilizado es un método enzimático llamado reacción acoplada Trinder-GOD-POD<sup>[1]</sup>. En esta, la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado, medido espectrofotométricamente en la región del visible, es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

Intervalos de referencia: Las concentraciones de glucosa en los niños menores de 5 años de edad son aproximadamente del 10 al 15 % más bajas que las encontradas en los adultos. En estos últimos, la concentración de glucosa en suero o plasma se encuentran en un intervalo que va de 70 – 105 mg/dL, equivalentes a aproximadamente 3.89 – 5.83 mM<sup>[1]</sup>.

### **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE AAS EN TABLETAS DE ASPIRINA®**

Bajo la convicción de que “la salud es un factor de suma importancia para el bienestar y desarrollo social de la comunidad”, la Secretaría de Salud, a través de la Dirección General de Insumos para la Salud y la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, expidió la norma oficial mexicana NOM-059-SSA1-1993 que establece los lineamientos básicos que la industria químico farmacéutica, dedicada a la fabricación de medicamentos y productos biológicos para uso humano, esta obligada a cumplir durante el proceso de fabricación para garantizar la calidad de sus productos<sup>[4]</sup>.

Esta norma especifica que se debe de llevar a cabo la evaluación analítica del producto en sus distintas etapas (materias primas, control en proceso, granel y producto terminado) de acuerdo a los métodos de análisis descritos en la FEUM o, en caso de que no aparezcan en la farmacopea mexicana, en cualquier farmacopea internacional. Entre las pruebas realizadas a los medicamentos se encuentra dos muy importantes, la valoración del contenido del fármaco y la uniformidad de dosis. Estas pruebas se llevan a cabo para el control en proceso, es decir, para monitorear si hay alguna falla durante el proceso de fabricación que se manifieste en la homogeneidad del contenido de fármaco, y para verificar si la cantidad de fármaco presente en el medicamento se encuentra dentro de especificaciones.

Por ejemplo: la cantidad de ácido acetilsalicílico, un fármaco ampliamente utilizado como analgésico, antipirético y algunas veces anticoagulante, contenido en tabletas de Aspirina<sup>®</sup>, puede cuantificarse espectrofotométricamente basándose en la siguiente reacción <sup>[5][6]</sup>:

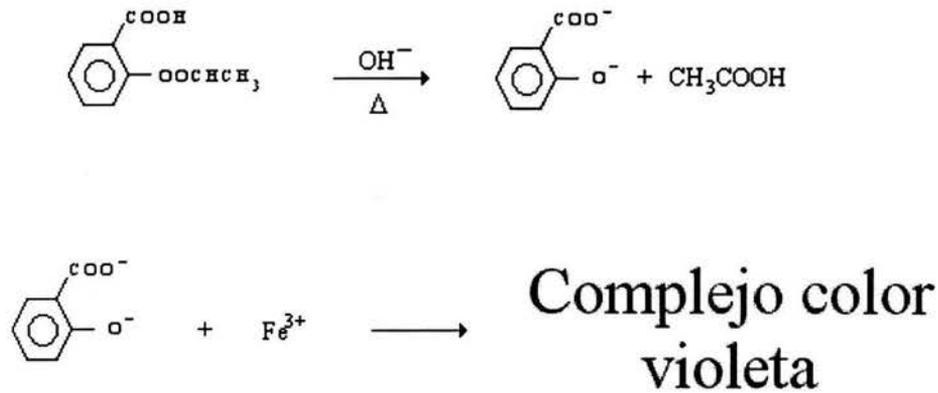


Fig. 2.1. Formación del complejo AS-Fe. Se genera el salicilato mediante una hidrólisis alcalina del AAS, posteriormente el salicilato reacciona con el ion  $\text{Fe}^{3+}$  y se forma el complejo que proporciona una coloración violeta.

De acuerdo con las concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  y de ácido salicílico con las que se trabaja y al diagrama  $\text{pFe(AS)}_x = f(\text{pH})$  que se muestra en la figura 2.3<sup>[7]</sup>, el complejo formado corresponde al que tiene la siguiente estructura:

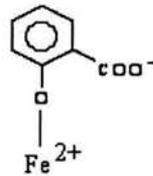


Fig. 2.2. Estructura del complejo formado entre el salicilato y el  $\text{Fe}^{3+}$ , es decir el  $\text{FeAS}^+$ .

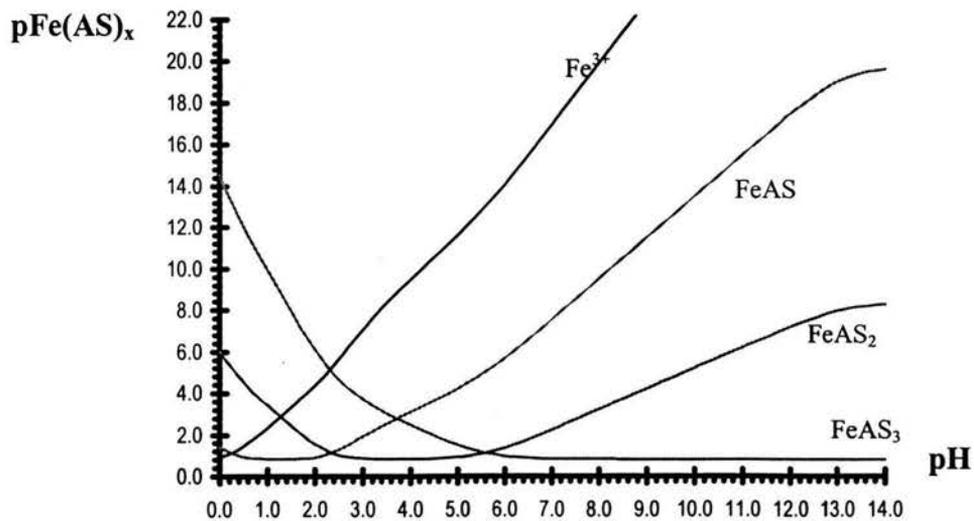


Fig. 2.3. Diagrama  $\text{pFe(AS)}_x = f(\text{pH})$ .

El color violeta del complejo Fe-AS formado, se aprovecha para realizar las mediciones de absorción en la región del visible. De acuerdo a las especificaciones de la FEUM, la cantidad de AAS en tabletas debe contener no menos del 95.0 por ciento y no más del 105.0 por ciento de la cantidad de AAS indicada en el marbete <sup>[6]</sup>.

## REFERENCIAS DE CAPÍTULO

- [1] Kaplan, L. A. *et. al.* Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlations. 3<sup>rd</sup> edition. Pp. 521, 1033, 1035 y 1383.
- [2] Anderson, S. C. Química Clínica. Interamericana Mc Graw-Hill. México, D. F., 1995. pp. 147.
- [3] [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- [4] NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
- [5] Kemp, Daniel S. y Vellaccio, Frank. Química Orgánica. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 1986. pp. 755.
- [6] SSA. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7<sup>ma</sup> edición. México, 2000. pp1042 y 1044.
- [7] Cortesía del M. en C. Alberto Gómez Pedroso Gudiño.

---

## Diseño y construcción de MIMC's

- Diseño de MIMC's
  - Construcción de MIMC's
- 

*Del buen o mal diseño de los microfotocolorímetros dependerán los resultados que se obtengan al probarlos, es por eso que se hace mucho énfasis de este aspecto en el presente capítulo. De igual manera, su construcción debe hacerse cuidando todos los detalles para garantizar el buen trabajo de los equipos.*

### DISEÑO DE MIMC's

#### **Diseño general:**

El diseño de los tres prototipos de MIMC's se hace siguiendo el esquema lineal de la instrumentación óptica: la fuente de radiación, el sistema dispersivo, la celda de absorción, el fotodetector y el registrador.

Se pretende colocar los componentes dentro de una caja negra para que impida o disminuya el paso de la luz exterior al interior del sistema. Esta puede ser una caja de cartón, plástico o cualquier material barato y accesible.

Como fuente de energía se puede utilizar una pila o directamente la luz de uno de los contactos del laboratorio, claro, en el segundo caso se debe utilizar un eliminador de voltaje. La fuente de radiación debe emitir luz blanca y puede utilizarse un led o un foco miniatura de los comúnmente llamados "de gota".

Lo más sencillo y barato para el sistema dispersivo es un filtro de absorción hecho de una placa transparente de vidrio o plástico pintado, un gel teñido colocado entre dos laminillas de vidrio o bien, de una disolución de una sustancia colorida contenida dentro de una campana de Durham ; en el laboratorio contamos con muchos compuestos que forman diso

Pequeñísimos tubos de vidrio parecidos a los tubos de ensayo, utilizados en microbiología para atrapar los gases producidos por el metabolismo bacteriano en medios de cultivo líquidos.

luciones coloridas y en el mercado existen muchos colorantes vegetales y artificiales que funcionan muy bien para éste fin (ver Apéndice A), por lo que la tercera alternativa parece ser la opción.

Como fotodetector se utiliza una pequeña fotorresistencia llamada celda, de 2 MOhms de resistencia en la oscuridad y 50 KOhms máximo <sup>[1]</sup>.

Al ser el detector una fotorresistencia, la respuesta que genera es, obviamente, una resistencia al flujo de electrones, por lo tanto el registrador que se utilice debe medir esta propiedad; para ello se utiliza un multímetro digital económico en su faceta de óhmetro. Existen multímetros muy baratos y de diferentes tamaños.

Los prototipos de MIMC's difieren en el tamaño, la forma y, principalmente, en la celda de absorción. A continuación se describen las celdas utilizadas y se muestran los esquemas de cada uno de los MIMC's:

### Diseño del 1er prototipo de MIMC

En este modelo tanto para el contenedor de la disolución del filtro de absorción como para la celda de absorción se utilizan campanas de Durham. La microcelda de absorción es móvil, es decir, la celda se puede sacar y meter en cada cambio de muestra, aunque también puede hacerse sin mover la microcelda con la ayuda de una jeringa de 3 mL adaptada con una punta de micropipeta, con la cual se extrae y se deposita la muestra (Fig. 3.1).

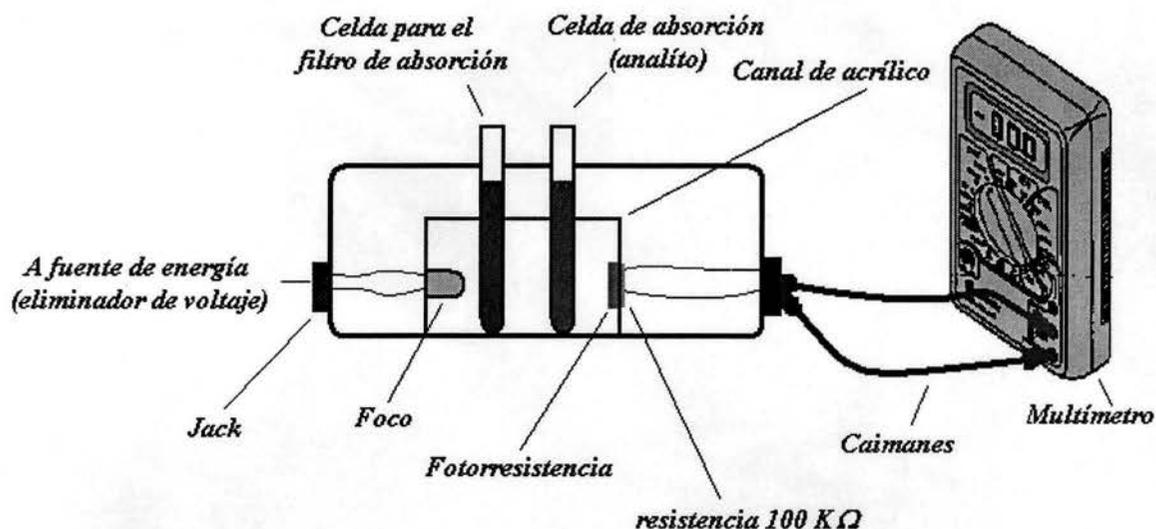


Fig. 3.1. Esquema del primer prototipo de MIMC

### Diseño del 2do prototipo de MIMC

En el segundo modelo se sigue conservando la campana de Durham como contenedor del filtro de absorción, pero la celda ha sido sustituida por un tubo capilar de vidrio que

atraviesa transversalmente todo lo alto de la caja. El capilar está abierto por ambos extremos, en cuya salida se encuentra adaptada una llave de tres vías de plástico<sup>‡</sup> que facilita el desagüe de las muestras, el enjuague de la celda y la inyección de la siguiente disolución. La microcelda de absorción se encuentra fija y los cambios de muestra se realizan con una jeringa de insulina adaptada en la punta a un trozo de tubo de plástico flexible que embona perfectamente con el extremo libre del capilar (Fig. 3.2).

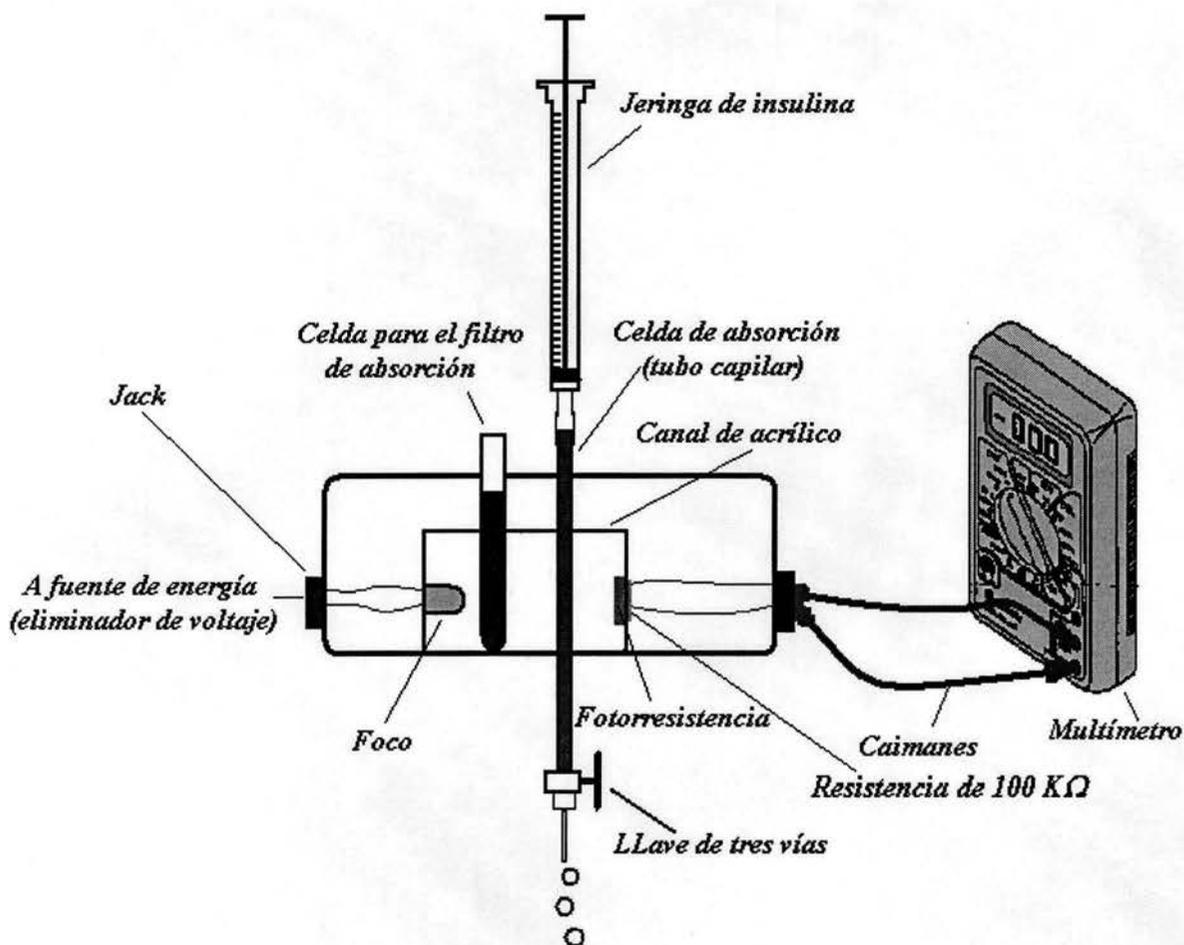


Fig. 3.2. Esquema del segundo prototipo de MIMC

### Diseño del 3er prototipo de MIMC

En el tercer prototipo la campana de Durham del filtro de absorción es sustituida por un tubo de acrílico transparente aproximadamente del mismo tamaño, y la celda de absorción por una microcelda para ensayos enzimáticos utilizada en las prácticas inmunológicas. La microcelda de absorción se encuentra fija y los cambios de muestra, al igual que en el primer modelo, se hace con una jeringa adaptada con una punta de micropipeta (Fig. 3.3).

<sup>‡</sup> Llaves utilizada en las prácticas médicas de venoclisis, generalmente para controlar la dirección del flujo de las disoluciones parenterales de gran volumen rehidratantes, de fármacos o de suplementos alimenticios, coloquialmente llamados sueros.

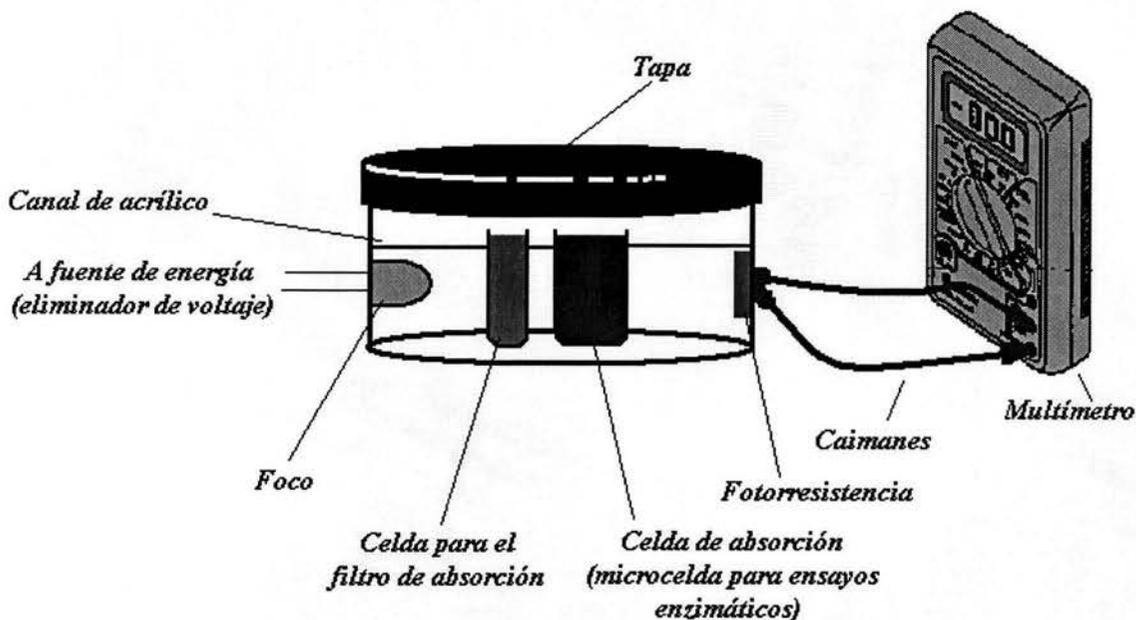


Fig. 3.3. Esquema del 3er prototipo de MIMC.

## CONSTRUCCIÓN DE MIMC's

Las piezas que componen al microfotocolorímetro son fáciles de conseguir, tienen un costo bajo e incluso puede utilizarse material reciclado que cumpla con los requisitos de diseño. Una vez que se cuenta con todo el material se puede comenzar a construir el MIMC. A continuación se describe *a grosso modo* la construcción de cada uno de los prototipos:

### **Construcción del 1er prototipo de MIMC**

La cubierta elegida para el MIMC 1 se trata de una caja de plástico negro llamada "gabinete"<sup>[1]</sup>. Con un minitaladro esmerilador se perforan las paredes y la tapa de la caja, justo en el sitio donde irán el filtro, la celda de absorción, y los "jacks" que sirven como contactos para la fuente de energía y el multímetro. Posteriormente se coloca el foco y la fotorresistencia, ambos insertos en una placa de acrílico pintado de negro mate, a una distancia uno de otro de aproximadamente 3 cm; para ello se utiliza pegamento líquido instantáneo Kola Loka<sup>®</sup>. A la fotorresistencia se le conecta, en paralelo, una resistencia de 100 k $\Omega$  (en el siguiente capítulo se hablará ampliamente de su función). Con la ayuda de placas de acrílico pintadas de negro, se forma una especie de canal para dirigir la luz hacia el filtro, la celda de absorción y la fotorresistencia. Entonces, las terminales de ambas piezas se sueldan a los contactos auxiliándose de cable de pequeño calibre. Las ranuras que quedan se cubren con cinta de aislar negra para evitar fugas de luz y para aislar lo más que se pueda a la fotorresistencia de la radiación no monocromada. El dispositivo

<sup>[1]</sup> La pintura negra mate, además de evitar la entrada de luz exterior al sistema, disminuye los fenómenos de reflexión de la luz debido a la opacidad de la pintura.

completo se cierra colocando la tapa en su lugar y asegurándola con sus respectivos tornillos (Fig. 3.4).

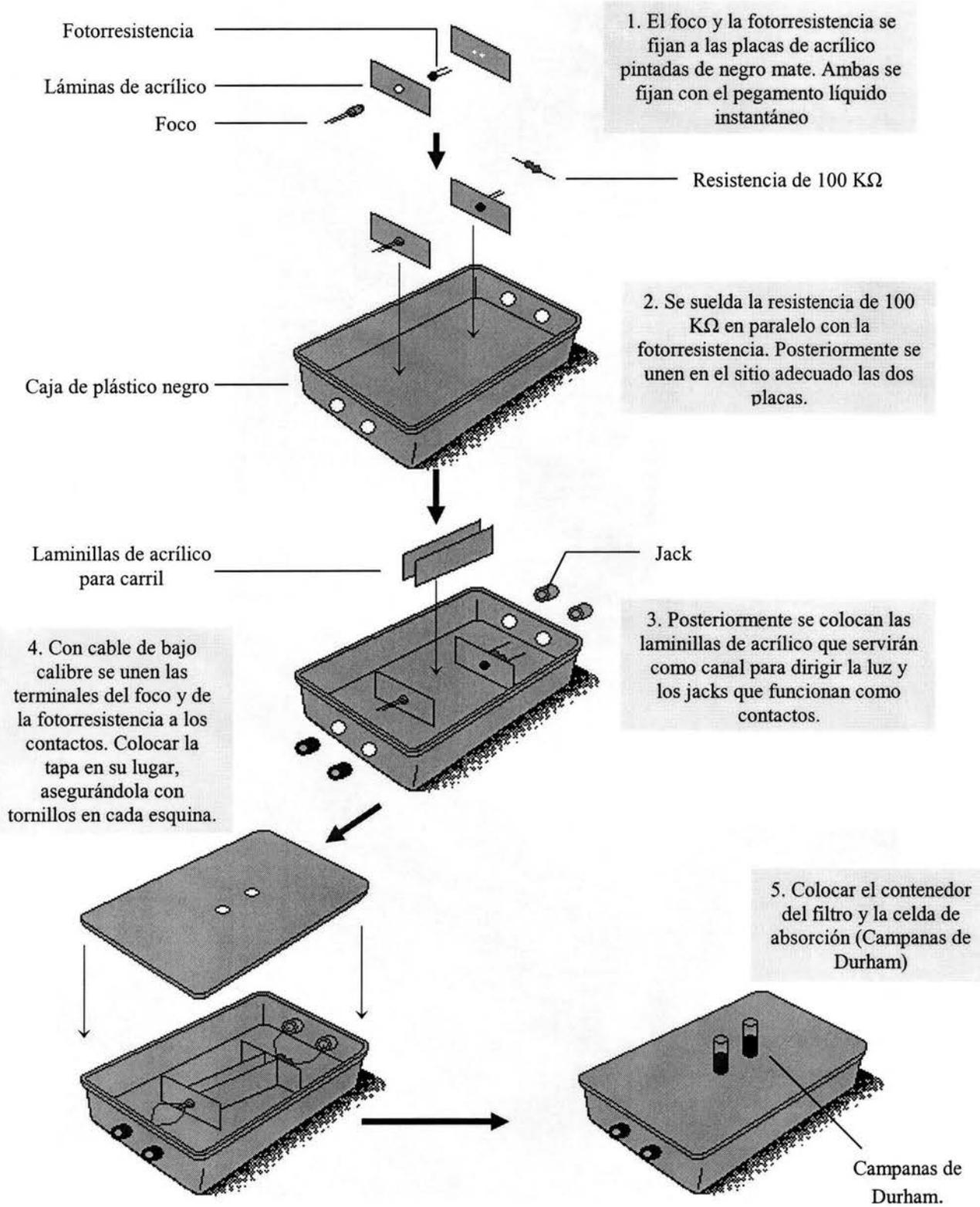
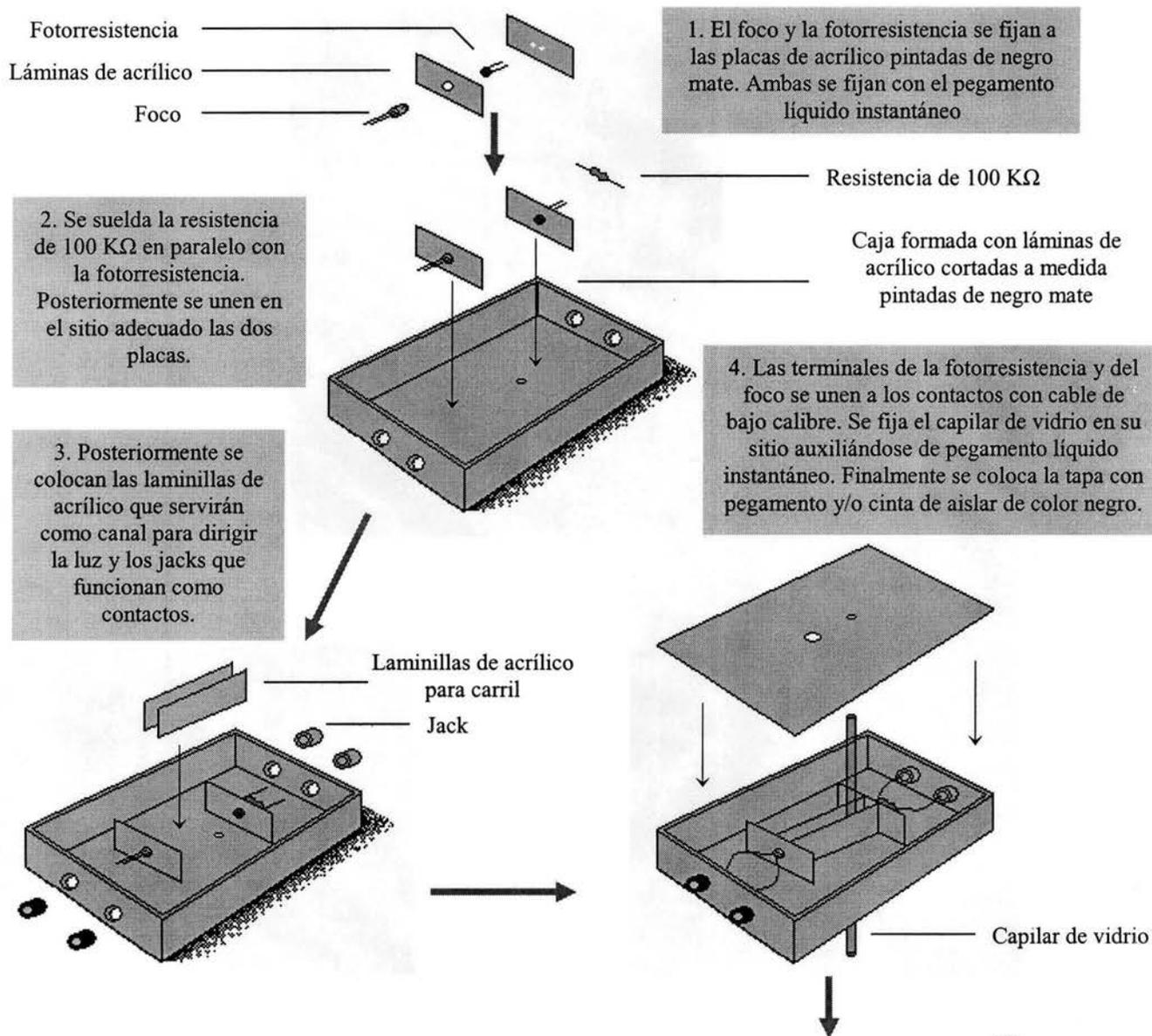


Fig. 3.4. Construcción del 1er prototipo de MIMC

### Construcción del 2do prototipo de MIMC

A diferencia del MIMC 1, la cubierta de este modelo se construye con placas de acrílico, de dimensiones predeterminadas, pintadas de negro mate. Al igual que con el modelo anterior, se hacen las perforaciones pertinentes: para el filtro, los conectores, y para el capilar de vidrio que funge como celda de absorción. Para este último se hacen orificios tanto en la base como en la tapa de tal manera que se superpongan, esto para que el capilar quede totalmente vertical. La unión de las piezas se hace con el pegamento líquido instantáneo. Se colocan el foco, la fotorresistencia, la resistencia de 100 KΩ y el carril de la misma manera que con el 1er prototipo. Se fija el capilar con el pegamento adhesivo, al que después se le adapta la llave de tres vías uniendo estas dos piezas mediante un trozo de tubo de plástico flexible. La llave se fija a una pequeña placa de acrílico que sobresale en la parte inferior de la caja. El sistema se cubre con la tapa y se terminan de pegar el resto de las piezas que le dan la forma inclinada al MIMC; esta inclinación proporciona un ángulo que hace muy cómoda la operación al químico analista, desde el cual puede observar la llave de tres vías y el extremo inferior del capilar. Finalmente, las ranuras por las que pueda entrar luz exterior al sistema se pueden cubrir con trozos de cinta aislante negra (Fig. 3.5).



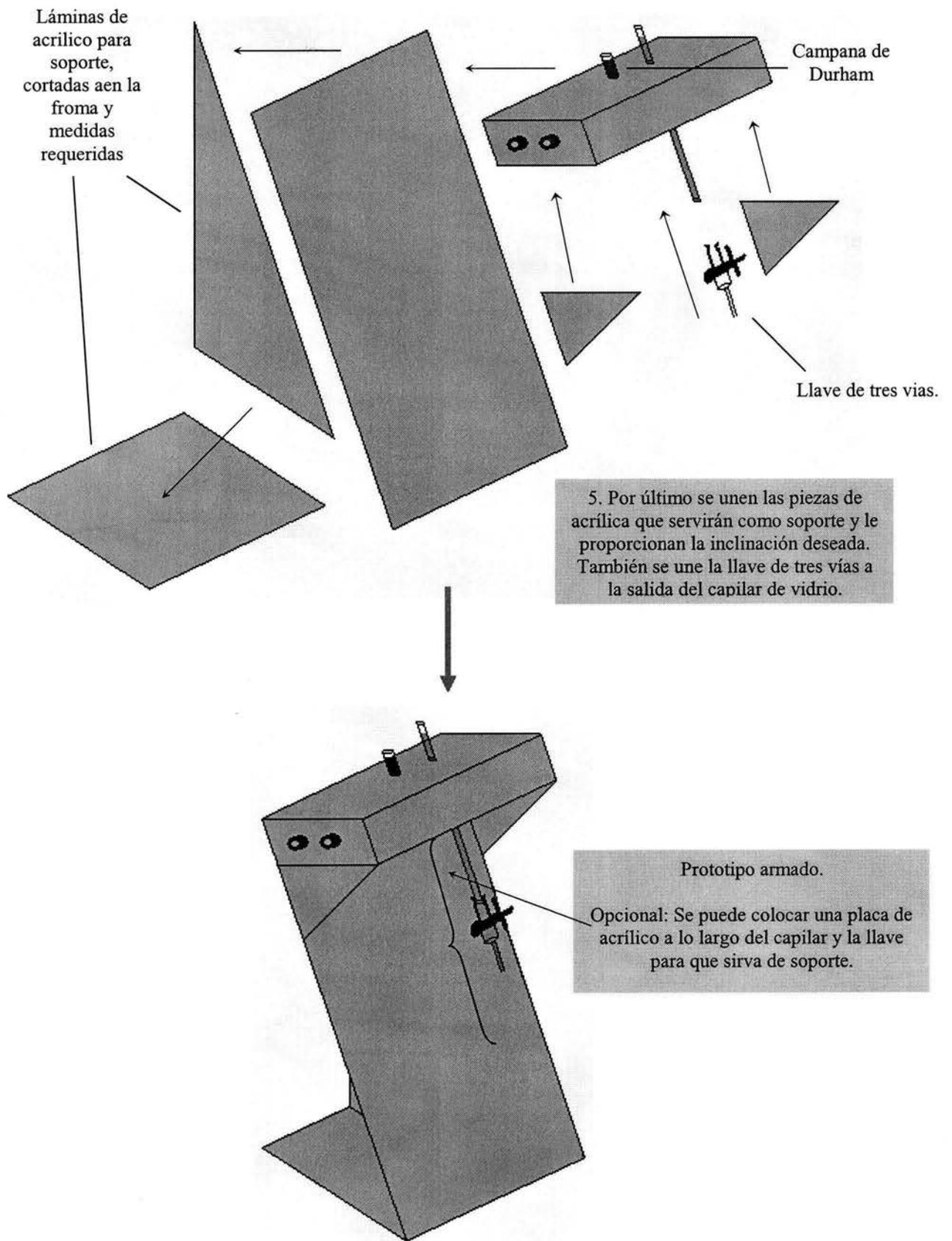


Fig. 3.5. Construcción del 2do prototipo de MIMC.

### Construcción del 3er prototipo de MIMC

El tercer prototipo es el más sencillo, barato y pequeño de todos. La caja es de forma circular ya que se trata de un pequeño trozo de tubo de acrílico de grueso calibre sobre una base de lámina acrílica cuadrada de 3 x 3 cm. También se encuentra pintado con negro mate y perforado por los lados, justo donde se colocarán los conectores para el multímetro y la fuente de energía, que por cierto, ya no se trata de jacks, si no de pequeñas laminillas de latón utilizadas en electrónica como terminales. También se hacen orificios para el foquito y la fotorresistencia; la tapa carece de perforaciones ya que ni el contenedor del filtro ni la celda de absorción sobresalen del microfotocolorímetro. Entonces, se coloca el foco y la fotorresistencia en su lugar con el líquido adhesivo, y tanto el filtro como la microcelda de absorción se fijan con pegamento instantáneo a la base del sistema. El carril que dirige la luz se construye de la misma manera que en los modelos anteriores. La tapa es móvil, ya que se debe quitar para hacer el cambio de muestra y los lavados de la celda, y se trata de una tapa de los contenedores de los rollos fotográficos (Fig. 3.6).

En los tres modelos el multímetro y la fuente de energía (eliminador de voltaje universal) se conectan mediante cables con terminación de lámina acabado niquelado en forma de pinza llamados "caimanes".

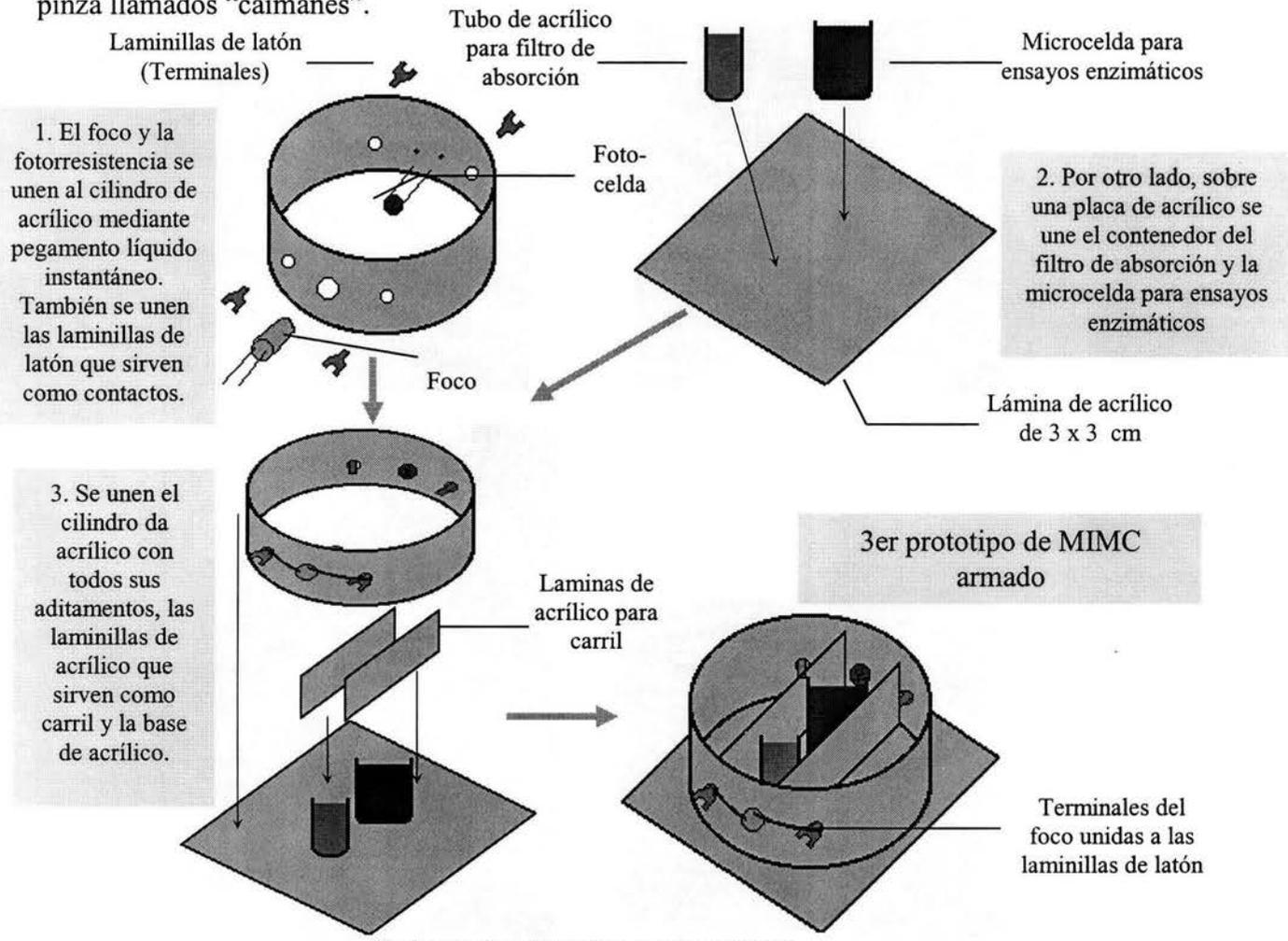


Fig. 3.6. Construcción del 3er prototipo de MIMC.

## MATERIALES Y REACTIVOS DE CAPITULO

- Caja negro o “gabinete” de 2.2 cm de alto, 5.7 cm de ancho y 11.2 cm de largo
- Minitaladro esmerilador
- Campanas de Durham
- Jacks
- Minifoco de 6 V
- Celda fotorresistiva
- Láminas de acrílico
- Pintura en aerosol de color negro mate
- Pegamento líquido instantáneo Kola Loka®
- Cable de cobre de pequeño calibre
- Resistencias de carbón de 100 K $\Omega$ , y de ¼ ó ½ W
- Cinta de aislar negra
- Capilar de vidrio de 0.2 cm de diámetro.
- Llave de tres vías
- Tubo de plástico flexible
- Tubo de acrílico de alto calibre
- Tubo de acrílico de bajo calibre
- Microcelda para ensayos enzimáticos
- Terminales (laminillas de latón)
- Multímetro digital económico: 200  $\Omega$ , 2 K $\Omega$ , 20 K $\Omega$ , 200 K $\Omega$  y 2000 K $\Omega$ .
- Caimanes
- Eliminador universal de voltaje: Entrada 110/120 VCA y 50-60 Hz.

## REFERENCIAS DE CAPITULO

- [1] Catalogo *Steren*®, 2004.

## 4

---

## Caracterización de los MIMC's

- La respuesta residual: ¿medición o determinación?
  - Comportamiento de la respuesta con y sin la utilización de un regulador de voltaje
  - Efecto del filtro de absorción
- 

*Antes de retar a los microfotocolorímetros con las determinaciones cuantitativas propuestas se debe poner a punto su funcionamiento, y para ello se realizan una serie de pruebas que en conjunto se les llama caracterización. Los resultados de estas pruebas serán muy importantes para los experimentos posteriores, veamos:*

### **LA RESPUESTA RESIDUAL: ¿MEDICIÓN O DETERMINACIÓN?**

Muchas veces, la fotorresistencia utilizada como fotodetector genera una resistencia tan grande que ni en la escala más alta del multímetro se logra medir, y se dice que se llega a un punto de saturación del registrador. La saturación no se presenta en todos los casos, depende mucho del microfotocolorímetro utilizado e incluso del lote de fabricación al que pertenezca la fotorresistencia. Si se llega a presentar, ocurre cuando la fuente de radiación se encuentra apagada o cuando la intensidad luminosa emitida por el foco es muy débil. Entonces, como es de esperarse, la respuesta residual, que recordemos se mide con la luz apagada, no podrá efectuarse. Afortunadamente se hallaron dos soluciones a este problema.

#### **Uso de una resistencia**

La primera de ellas es el uso de un resistor de carbón conectado en paralelo a la fotorresistencia. La conexión se hace de ésta manera porque la colocación de los resistores en paralelo siempre disminuye la resistencia total del circuito <sup>[1]</sup>, de tal forma que se logra disminuir la enorme resistencia generada en el fotodetector, y el multímetro ya no se satura. Así, es posible “medir” la respuesta residual.

El resistor utilizado es de  $100\text{ K}\Omega$ , lo que sitúa la lectura de la respuesta en la escala intermedia del multímetro.

### La respuesta residual encontrada por extrapolación

La segunda solución es la “determinación” de la respuesta residual por extrapolación en una gráfica  $\text{Respuesta} = f(\text{Voltaje impuesto})$ . A voltajes muy bajos el foco emitirá una luz tan tenue que la resistencia generada en el fotodetector será muy grande que saturará al multímetro, y a medida que el voltaje impuesto aumente, esta resistencia irá disminuyendo hasta obtener respuestas medibles en el registrador. Al graficar estas variables se obtienen una serie de puntos con una tendencia exponencial cuando los valores de voltaje son cercanos a cero, la cual se aprovecha para extrapolar los puntos que le confieren esta forma para determinar la respuesta residual (Fig. 4.1).

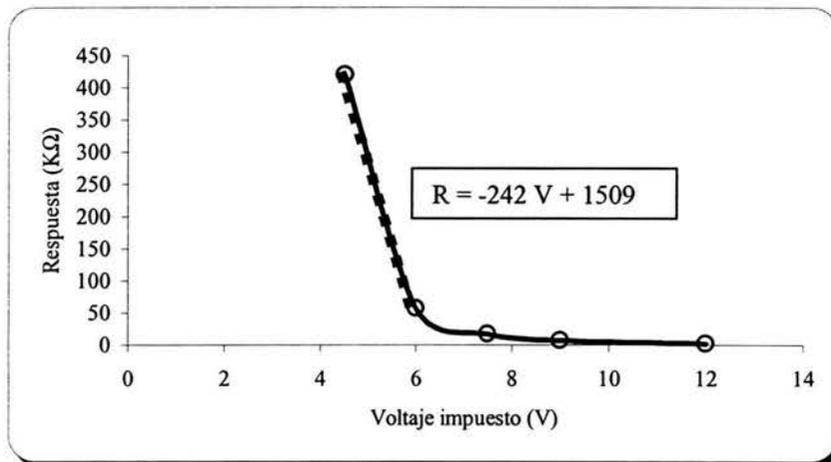


Fig. 4.1. Gráfica que representa la respuesta obtenida a cada voltaje impuesto y la determinación de la respuesta residual por extrapolación

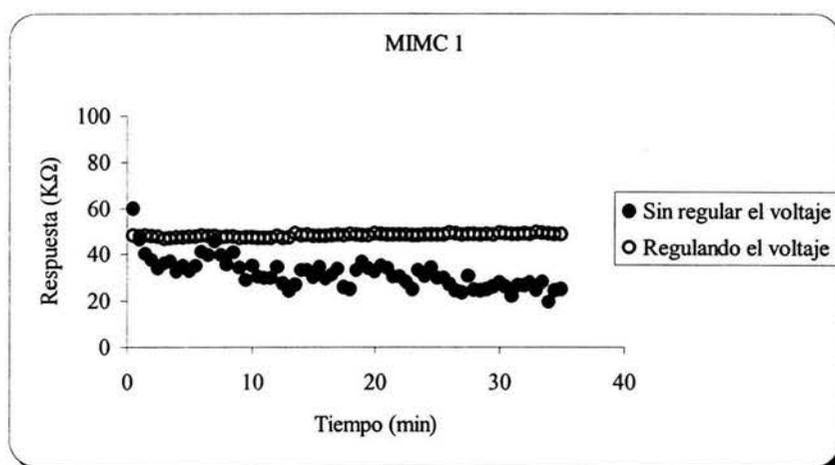
En la figura 4.1 se ilustran las respuestas obtenidas a cada voltaje impuesto y la determinación de la respuesta residual con una regresión lineal de los 2 puntos que muestran la tendencia de un incremento exponencial cuando el voltaje disminuye, encontrándose una respuesta residual de  $1509\text{ K}\Omega$ . Estos son los resultados obtenidos con un ejemplar del tercer prototipo de MIMC tomado al azar, con otro no hubo la necesidad de realizar este experimento ya que, aún con la luz apagada, el multímetro proporcionaba una lectura.

Cabe señalar que en caso de saturación, la determinación de la respuesta residual por éste método es individual para cada ejemplar, y no es válido utilizar el valor de respuesta residual de un equipo con otro, de lo contrario, se introduce un error en el cálculo del parámetro adimensional  $pT$  o absorbancia. Lo ideal es que el fenómeno de saturación no se presente.

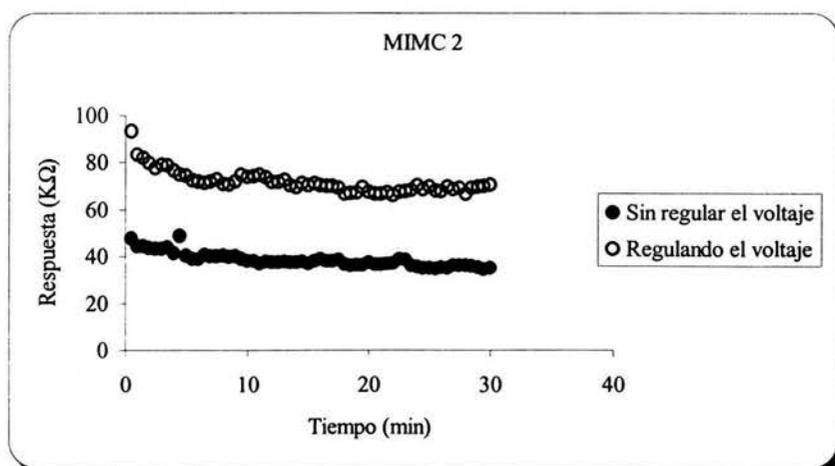
## COMPORTAMIENTO DE LA RESPUESTA CON Y SIN LA UTILIZACIÓN DE UN REGULADOR DE VOLTAJE

Un factor muy importante en microfotocolorimetría es que la fuente de radiación proporcione una salida de luz constante y uniforme; sin embargo, su salida no será más constante que la energía que se le proporcione. Entonces, las fluctuaciones de voltaje en las tomas de corriente influirán considerablemente en las variaciones de la intensidad luminosa emitida por el foco.

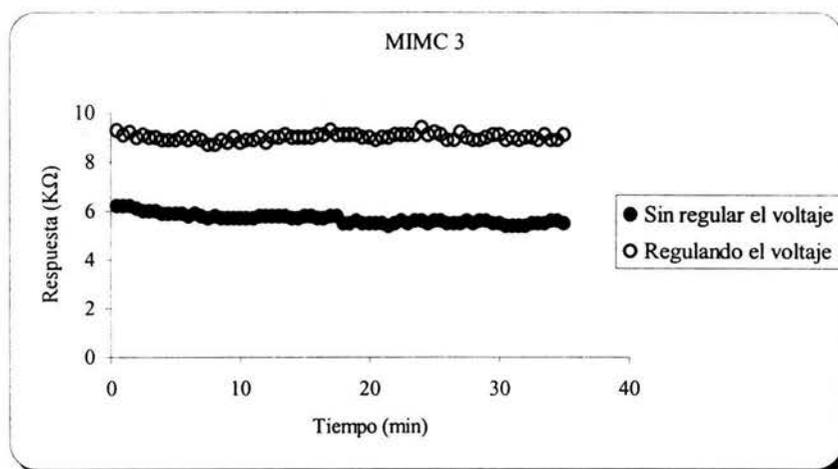
Para demostrar que con el uso de un regulador de voltaje se disminuyen estas variaciones se hace un experimento muy sencillo, que consiste en registrar la lectura de la respuesta cada medio minuto durante 30 o 35 minutos con el voltaje regulado y sin regular el voltaje (Fig. 4.2). El experimento se hace a un voltaje impuesto constante: para el MIMC 1 y MIMC 3 se utilizan 4.5 V, y para el MIMC 2 se utilizan 6 V. A continuación se muestran las gráficas obtenidas para cada prototipo:



a)



b)



c)

Fig. 4.2. Comportamiento de la respuesta del detector, a voltaje constante, durante 35 minutos con y sin regulación de voltaje. a) Resultados del 1er prototipo de MIMC, b) resultados del 2do prototipo y c) resultados del 3er prototipo.

El efecto de la regulación del voltaje es evidente, principalmente en el 1er y 2do prototipo, en donde se nota una mayor dispersión de la respuesta del detector cuando el voltaje no se regula. En el caso del 3er prototipo no hay diferencia entre la respuesta obtenida con regulación de voltaje y la obtenida sin regularlo, esto se debe principalmente a la calidad del foco utilizado, que cabe aclarar, los focos utilizados para la construcción de la serie de este modelo fueron comprados en una tienda diferente, y aunque son de las mismas especificaciones puede que difieran en la marca o el lote de producción.

El uso del regulador de voltaje provoca que la corriente que llega al eliminador y posteriormente al foco disminuya en voltaje, provocando que la intensidad luminosa de salida sea menor, manifestándose en el aumento del valor de la respuesta medida cuando se regula el voltaje (Ver Fig. 4.2 a, b y c). Este fenómeno no afecta en nada las determinaciones posteriores, por lo que puede quedar ignorado.

A partir de aquí, los experimentos siguientes se hacen a voltaje regulado, dejando siempre unos 10 minutos de calentamiento del sistema (foco y multímetro prendidos), porque como se puede observar en la Fig. 4.2, el comportamiento más estable sucede a partir de los 10 minutos aproximadamente.

### **EFEECTO DEL FILTRO DE ABSORCIÓN**

Recordará el lector que en el capítulo 1, en el apartado de instrumentación, se calificó al sistema dispersivo como una parte muy importante, debido a que en él radica la calidad de un espectrofotómetro o un fotocolorímetro, y que a su capacidad de monocromación se deberá el aumento de la sensibilidad a las medidas de absorbancia y la selectividad del análisis.

Por estas razones se corrobora que el filtro de absorción utilizado disminuya el número inicial de longitudes de onda incidentes midiendo la respuesta del detector cada 2 minutos

durante 1 hora (Fig. 4.3) con el tercer prototipo de MIMC, primero sin utilizar filtro y después utilizando un filtro de absorción hecho a base de una disolución del colorante vegetal rojo # 2.

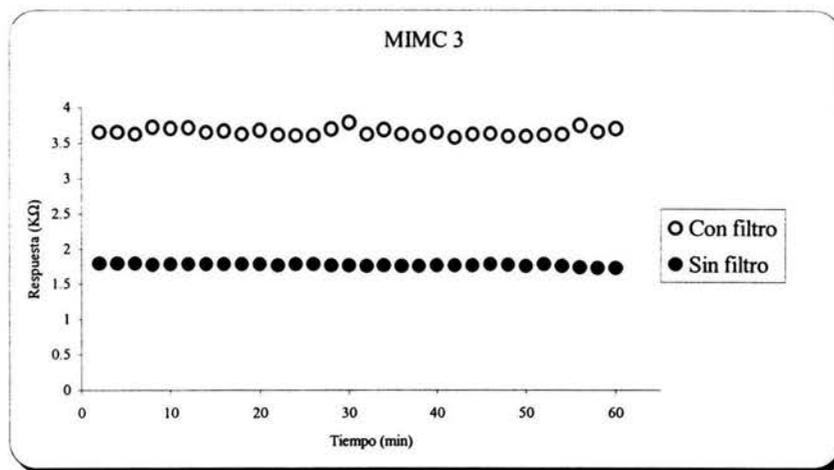


Fig. 4.3. Efecto del filtro de absorción sobre la respuesta del detector utilizando el primer prototipo de MIMC.

El simple hecho de que en la Fig. 4.3 se aprecie un marcado aumento de la respuesta del detector, indica que el filtro de absorción reduce el número inicial de longitudes de onda incidentes. Recordar que, como se vio en la primera parte de éste capítulo, al disminuir la intensidad luminosa la resistencia generada en el fotodetector se incrementa. Puede ser que este experimento no sea totalmente concluyente pero los resultados presentados son muy convincentes. Otro experimento más contundente de que la monocromaticidad se está logrando con los filtros de absorción utilizados se describe en el siguiente capítulo.

## MATERIALES Y REACTIVOS DE CAPÍTULO

- Un ejemplar del 3er prototipo de MIMC
- Regulador de voltaje VICA
- Colorante vegetal rojo # 2

## REFERENCIAS DE CAPÍTULO

- [1] Murphy, J. T. y Smoot, R. C. Física. Principios y problemas. CECSA. México, 1995. pp. 371

## Ensayos preliminares

- Efecto del filtro de absorción en las curvas de calibración de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado
- ¿Cómo determinar el intervalo de concentraciones de trabajo? Las gráficas de Ringbom: la solución

*Hasta esta parte no se ha demostrado el funcionamiento de los microfotocolorímetros con alguna disolución de especie absorbente. Pero antes de seguir avanzando y de someter a los MIMC's a pruebas más rigurosas, se hacen unos ensayos previos con muestras muy sencillas para que su tratamiento y análisis no se compliquen; todo con la finalidad de detectar posibles fallas y corregirlas a tiempo. Además contribuyen a la caracterización de los equipos:*

### EFFECTO DEL FILTRO DE ABSORCIÓN EN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ EN MEDIO AMONICAL CONCENTRADO

En la literatura se reporta<sup>[1]</sup> que el  $\text{Cu}^{2+}$  en medio amoniacal forma un complejo de color azul intenso  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^+$  (tetra-amincobre). Aprovechando esta cualidad del catión divalente del cobre, se preparan disoluciones de nitrato de cobre en medio amoniacal de diferente concentración, a las cuales se les determinará su absorbancia en los MIMC's. Como filtro de absorción se utiliza una disolución del colorante rojo # 2 a una concentración de 108  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que es el que aísla la longitud de onda máxima del complejo de cobre (Fig. 5.1).

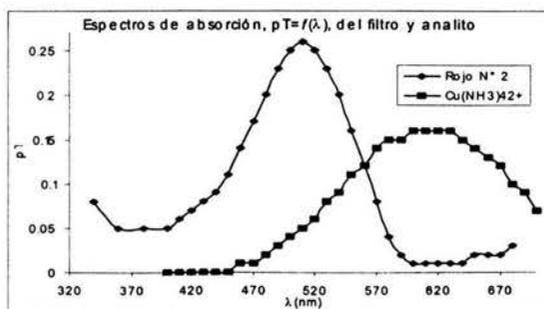


Fig. 5.1. Espectros de absorción del tetra-amincobre y del filtro de absorción rojo # 2. El filtro aísla la longitud de onda máxima del complejo de cobre<sup>[2]</sup>.

Este experimento tiene tres objetivos: el primero es demostrar que el pT de las disoluciones determinado con los MIMC's es directamente proporcional a la concentración de analito, es decir, la linealidad del método; el segundo es complementar la evidencia de que con el filtro de absorción utilizado se logra la monocromaticidad deseada, y el tercero es ejemplificar la determinación del pT con los cálculos pertinentes.

### Metodología

Pesar aproximadamente con exactitud 187.6 mg de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en una nave, vaciar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con agua destilada; esta disolución stock tiene una concentración de 0.1 M. Tomar alícuotas de 440, 500, 600, 700 y 800  $\mu\text{L}$  y llevar al aforo a 2 mL con amoniaco concentrado.

Posteriormente, medir la respuesta residual, es decir, la respuesta con la luz apagada; accionar el sistema y dejar 10 minutos de calentamiento. Transcurrido este tiempo comenzar con las mediciones iniciando con el blanco, que en este caso es el amoniaco concentrado, y siguiendo con el resto de las disoluciones siempre en orden creciente de concentración. Es muy importante enjuagar la celda de absorción entre cada muestra con un poco de la disolución que sigue en el orden de medición. El multímetro se programa como óhmetro.

### Resultados

Como se indica en la metodología descrita, se determinan las respuestas de cada una de las disoluciones estándar, primero utilizando el filtro de absorción y después sin filtro, y se repite la operación con cada uno de los prototipos de microfotocolorímetro. En la tabla 5.1 resumen las respuestas obtenidas en cada una de las determinaciones:

Tabla 5.1: Respuestas de disoluciones de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado en cada uno de los prototipos de MIMC, utilizando filtro de absorción y sin utilizarlo.

#	Volumen de stock agregado ( $\mu\text{L}$ )	[ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ] (mM)	MIMC 1		MIMC 2		MIMC 3	
			Respuesta con filtro ( $\text{K}\Omega$ )	Respuesta sin filtro ( $\text{K}\Omega$ )	Respuesta con filtro ( $\text{K}\Omega$ )	Respuesta sin filtro ( $\text{K}\Omega$ )	Respuesta con filtro ( $\text{K}\Omega$ )	Respuesta sin filtro ( $\text{K}\Omega$ )
$R_r$	---	---	100.1	100.1	98.3	98.3	777	777
$R_0$	0	0.0000	5.74	5.04	38.3	32	2.85	3.7
1	440	21.4840	12.47	8.7	42.6	35.8	15.07	13.5
2	500	24.4136	13.93	9.37	42.2	36.2	18.74	16
3	600	29.2964	17.05	10.8	43.4	37.1	22.5	20
4	700	34.1791	18.47	11.3	45	38	29.9	23.8
5	800	39.0618	21.5	12.05	46.4	39	36.3	30.9

### Determinación del pT

En el capítulo 1, en la sección "Ley límite de Lambert-Beer-Bouger", se dijo que la determinación del cociente  $I/I_0$ , conocido como transmitancia,  $T$ , puede efectuarse con la siguiente ecuación:

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

y que a partir de esta ecuación se puede determinar un segundo parámetro adimensional, conocido como absorbancia, de la siguiente manera:

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

Para ejemplificar el cálculo del pT se utilizarán los valores de la respuesta con filtro y el MIMC 1 de la disolución # 1, veamos:

$R_r$  tiene un valor de 100.1 K $\Omega$ ,  $R_0$  un valor de 5.74 K $\Omega$  y  $R_i$  de 12.47 K $\Omega$ . Sustituyendo los valores en la ecuación de transmitancia se tiene:

$$T = \frac{12.47 \text{ K}\Omega - 100.1 \text{ K}\Omega}{5.74 \text{ K}\Omega - 100.1 \text{ K}\Omega} = 0.9287$$

Al resultado anterior se le saca el  $-\log$  para determinar el pT:

$$pT = -\log(0.9287) = 0.0321$$

El cálculo del pT se puede realizar en una sola operación:

$$pT = -\log\left(\frac{12.47 \text{ K}\Omega - 100.1 \text{ K}\Omega}{5.74 \text{ K}\Omega - 100.1 \text{ K}\Omega}\right) = 0.0321$$

De esta forma se calculan todos los valores de absorbancia, los cuales se encuentran registrados en la siguiente tabla:

Tabla 5.2. Absorbancias de disoluciones de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado en cada uno de los prototipos de MIMC, utilizando filtro de absorción y sin utilizarlo.

#	Volumen de stock agregado ( $\mu\text{L}$ )	[ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ] (mM)	MIMC 1		MIMC 2		MIMC 3	
			pT con filtro (K $\Omega$ )	pT sin filtro (K $\Omega$ )	pT con filtro (K $\Omega$ )	pT sin filtro (K $\Omega$ )	pT con filtro (K $\Omega$ )	pT sin filtro (K $\Omega$ )
0	0	0.0000	0	0	0	0	0	0
1	440	21.4840	0.0321	0.0171	0.0323	0.0256	0.0069	0.0055
2	500	24.4136	0.0394	0.0203	0.0292	0.0284	0.0090	0.0070
3	600	29.2964	0.0555	0.0271	0.0386	0.0348	0.0112	0.0093
4	700	34.1791	0.0629	0.0296	0.0514	0.0412	0.0155	0.0114
5	800	39.0618	0.0794	0.0333	0.0630	0.0485	0.0191	0.0156

### Relación lineal entre la señal óptica y la concentración

La absorbancia o pT se asocia a los valores de concentración de disoluciones estándar para obtener una gráfica llamada *curva de calibración* ( $pT = f(C)$ ), que además de ser un método auxiliar en la determinación, por interpolación, de la concentración del analito absorbente en muestras de concentración desconocida, al determinar también el parámetro adimensional pT de dicha muestra <sup>[3]</sup>, permite verificar el grado de relación lineal o de

proporcionalidad del modelo por medio de una regresión lineal por mínimos cuadrados de los datos. Las curvas de calibración obtenidas con cada uno de los prototipos de MIMC son las siguientes:

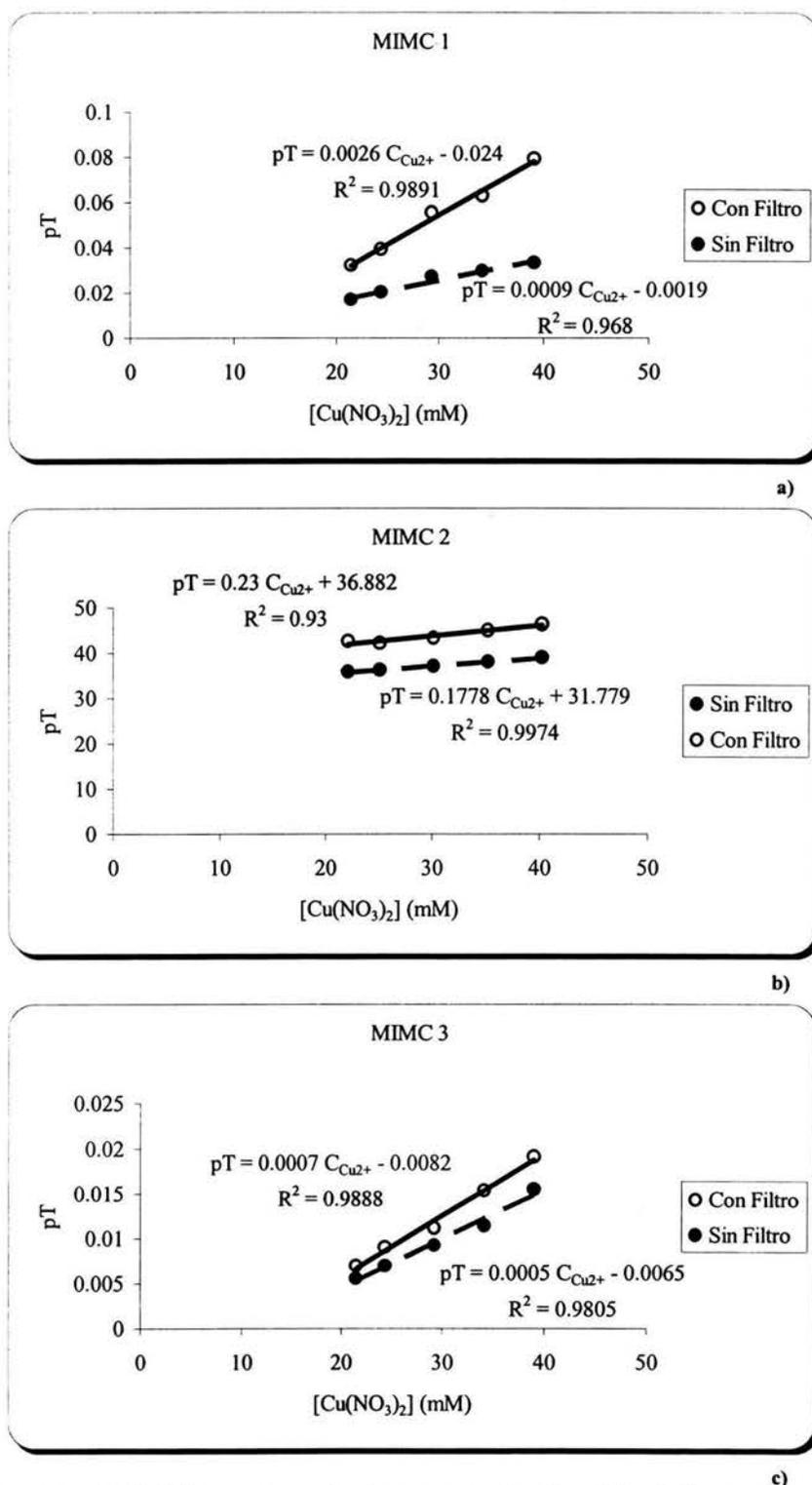


Fig. 5.2. Curvas de calibración de  $Cu^{2+}$  en medio amoniacal concentrado obtenidas utilizando filtro de absorción y sin utilizarlo. a) Curvas con 1er prototipo, b) curvas con 2do prototipo y c) curvas con 3er prototipo.

Aunque los coeficientes de correlación lineal obtenidos en estas gráficas no son totalmente satisfactorios, se puede decir que existe un comportamiento lineal de la respuesta en relación a la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$ . A excepción de 2do prototipo, todas las curvas presentan coeficientes mayores a 0.98, un buen indicio de linealidad del método. Muchas veces, la mala manipulación de las muestras puede ser la causa de que se obtengan curvas de calibración con coeficientes de correlación lineal bajos

Especialmente el 2do prototipo de microfotocolorímetro presenta el coeficiente de correlación lineal más alto y más bajo de la serie de curvas de calibración mostradas, pero también el único que presentó mucha inestabilidad durante la medición de la respuesta de las muestra. Además, la ordenada al origen de las curvas de calibración obtenidas con este modelo está muy lejos de cero, consecuencia de la inestabilidad de la lectura del multímetro durante las mediciones. Este comportamiento inestable, como se verá, se presenta durante todos los experimentos posteriores, y hasta no mostrarlos no se puede aseverar una causa a dicho patrón de respuesta.

### **Reducción del número inicial de longitudes de onda incidentes sobre el filtro**

En el capítulo 4 se puso de manifiesto que con el uso del filtro de absorción se reduce el número inicial de longitudes de onda que emergen de la fuente de radiación, logrando con ello su objetivo como selector de longitud de onda: obtener una radiación constituida por un grupo limitado, estrecho y continuo de longitudes de onda denominado ancho de *banda*.

Pues entonces, con los resultados mostrados en las gráficas de la Fig. 5.2 corroboramos y reforzamos dichas observaciones. Es evidente no sólo el aumento en la absorción de las muestras al utilizar el filtro, si no también el aumento del valor de la pendiente y del coeficiente de correlación lineal; a excepción del MIMC 2 por las razones que ya se explicaron.

El lector se preguntará ¿porqué el aumento del valor de estos parámetros indican monocromaticidad? La respuesta es muy sencilla: la reducción del ancho de banda aumenta la relación lineal entre la señal óptica y la concentración, es decir, se mejora la selectividad, se absorbe más radiación y por lo tanto el cambio de pendiente es inevitable. (Consultar la sección de Instrumentación en Sistema dispersivo: problemas más frecuentes).

### **¿CÓMO DETERMINAR EL INTERVALO DE CONCENTRACIONES DE TRABAJO?. LAS GRÁFICAS DE RINGBOM: LA SOLUCIÓN**

Las gráficas de Ringbom consisten en graficar un parámetro adimensional denominado absortancia en función del logaritmo de la concentración (Absortancia =  $f(\log [i])$ ), en donde la absortancia esta definida como *la resta de uno menos la transmitancia* ( $1 - T$ ).

Ringbom introduce este nuevo método de representar gráficamente los datos espectrofotométricos, alterno al de Lambert-Beer-Bouger, en el año de 1939.

Este método es de gran utilidad, muestra a simple vista el intervalo de concentraciones donde el error analítico es mínimo, es decir, el intervalo de concentraciones correspondiente a la porción prácticamente lineal de la pendiente de la gráfica, en otras palabras, permite determinar las concentraciones en donde la relación respuesta-concentración se comporta de manera lineal en la cual el error analítico se reduce al máximo<sup>[4]</sup>.

Como se puede ver, la determinación del intervalo de concentraciones de trabajo es muy importante, del grado de linealidad alcanzado por el método dependerá en gran medida la calidad del análisis. Especialmente para los microfotocolorímetros se debe determinar esta zona de trabajo para cada uno de los analitos a ensayar. Para el análisis de las disoluciones de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado también es necesario determinar esta zona:

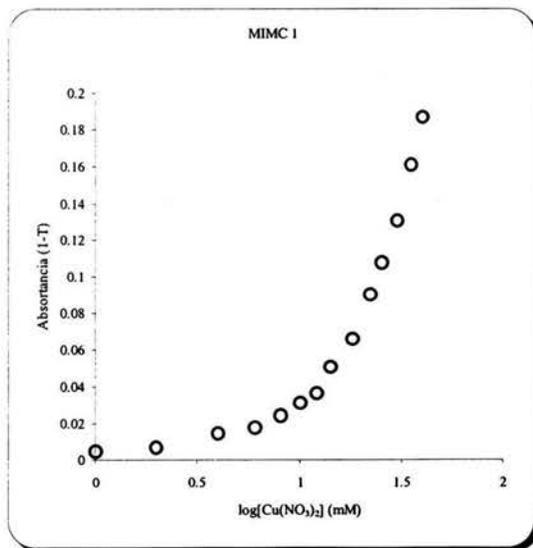
### Metodología

Pesar aproximadamente con exactitud 469 mg de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en una nave, vaciar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada; esta disolución stock tiene una concentración de 0.1 M. Tomar alícuotas de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.8, 2.2, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mL, colocarlas en un matraz de 10 mL y llevar al aforo con amoniaco concentrado.

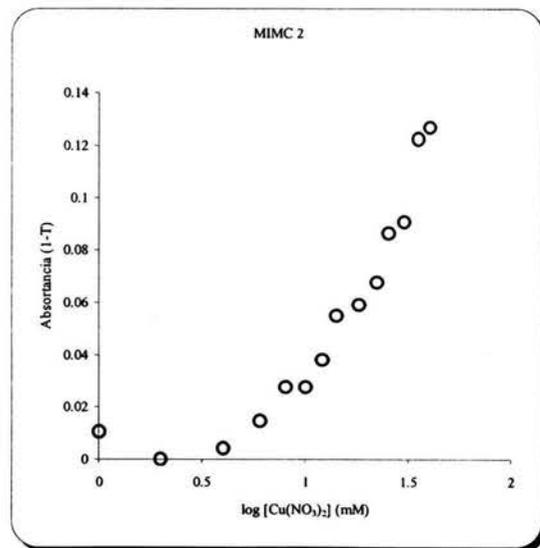
Hacer las mediciones de las respuestas de cada una de las disoluciones como se indica en la metodología de la primera parte de este capítulo en cada uno de los microfotocolorímetros, y realizar los cálculos de *Transmitancia* y *Absortancia* como en el ejemplo de este capítulo.

### Determinación de la zona lineal, del límite de detección y del límite de cuantificación

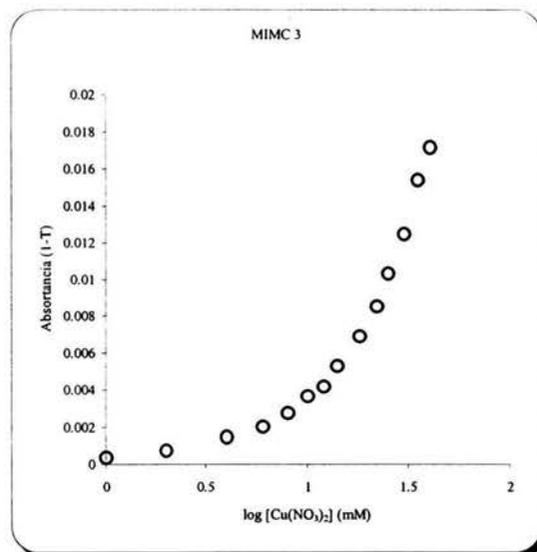
El uso de disoluciones que abarcan un gran intervalo de concentraciones permite obtener gráficas típicas en donde se identifica rápidamente la zona lineal. Por ejemplo, con la metodología descrita arriba se han obtenido las siguientes gráficas de Ringbom:



a)



b)



e)

Fig. 5.3. Gráficas de Ringbom con disoluciones de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado. a) Obtenida con el 1er prototipo de MIMC, b) obtenida con el 2do prototipo c) obtenida con el 3er prototipo.

El intervalo de concentraciones en el que la relación respuesta-concentración se comporta de manera lineal se encuentra entre 20 mM y 45 mM en los tres prototipos de MIMC, aunque nuevamente con el 2do prototipo de MIMC no es tan notorio.

Pero la determinación del intervalo de trabajo no es la única virtud de estas gráficas, también permiten la identificación del límite de detección y del límite de cuantificación del método. Para este sistema el límite de detección se encuentra entre 4 y 6 mM que son las concentraciones en donde ya se nota una diferencia entre la respuesta del blanco y una disolución estándar de baja concentración, y el de cuantificación se encuentra aproximadamente por 18 mM que corresponde a la primera concentración en donde empieza la zona lineal.

Estos parámetros son propios de cada analito y deben determinarse para cada nueva sustancia que quiera analizarse con estos equipos.

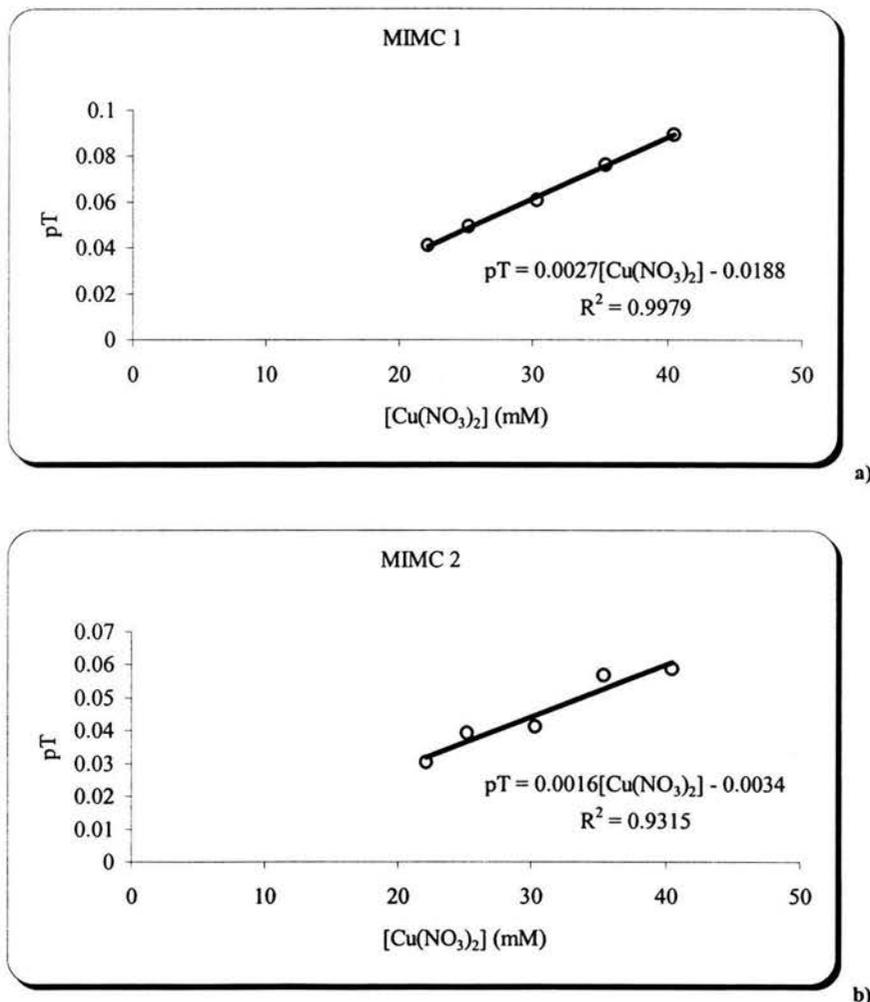
Otra ventaja que se observa con los resultados obtenidos es que aún a concentraciones muy altas el fotodetector o el registrador no se saturan, por lo que hay un amplio intervalo lineal en el que se puede trabajar, y en caso de muestras problema de alta concentración, no es necesario diluirlas para poder hacer la medición. Aunque no se alcanzaron concentraciones de saturación se puede predecir teóricamente cuando sucederá:

- a) Cuando la concentración es tan alta que la respuesta generada es igual o ligeramente mayor al valor de la resistencia que se conecta en paralelo al fotodetector, o sea, 100 K $\Omega$ . Claro, sucede sólo con los MIMC's que se construyen con este tipo de circuito.
- b) En los MIMC's en los que no hay fenómeno de saturación, sucederá cuando la concentración genere respuestas iguales o ligeramente mayores a la máxima escala de trabajo del multímetro generado, o sea, 2000 K $\Omega$ .

- c) Y aunque no es propiamente dicho que sucede una saturación del sistema, ya no se podrá hacer mediciones cuando las disoluciones superen la concentración máxima de solubilidad del analito; éste fenómeno se presenta en el análisis del ácido acetilsalicílico en el próximo capítulo, o cuando en el medio de reacción hay un reactivo limitante caso que se presenta en el capítulo 7 en la determinación cuantitativa de glucosa en suero sanguíneo.

**¿Se mejora el coeficiente de correlación lineal trabajando en el intervalo de concentraciones encontrado?**

Teniendo como antecedentes la obtención de curvas de calibración con un bajo coeficiente de correlación lineal, se decide trazar nuevamente curvas de calibración de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado utilizando el intervalo de concentraciones determinado con las gráficas de Ringbom. A partir de una disolución 0.1 M de nitrato de cobre se tomaron alícuotas adecuadas para obtener concentraciones de aproximadamente 22, 25, 30, 35 y 40 mM, se hicieron las mediciones, los cálculos correspondientes y se graficaron los resultados  $[pT = f(C_{\text{Cu}^{2+}})]$ . Las gráficas obtenidas se muestran en la siguiente figura (Fig. 5.4):



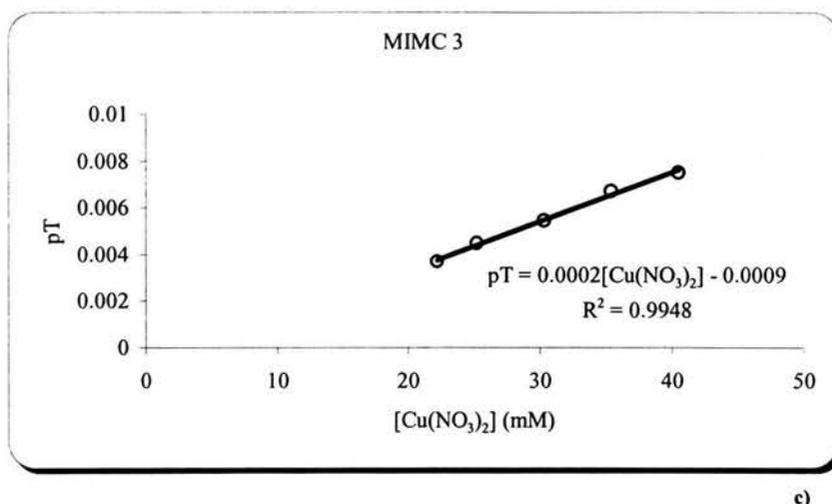


Fig. 5.4. Curvas de calibración de nitrato de cobre en medio amoniacal concentrado obtenidas trabajando en el intervalo de concentraciones determinado con las gráficas de Ringbom.

La mejoría es obvia, se ha alcanzado casi la perfección en la linealidad de las curvas de calibración, dos nueves después del punto decimal no hacen pensar más que eso; incluso, la curva de calibración obtenida con el 2do prototipo mejoró en cuanto a su forma y a la ordenada al origen obtenida, aunque no así en el coeficiente de correlación lineal que a penas fue de 0.93 unidades, pero si se observa la gráfica 2b se notará que este resultado se debe a la dispersión de los puntos que, nuevamente, es consecuencia de la inestabilidad de la lectura al hacer las mediciones.

## MATERIALES Y REACTIVOS DE CAPITULO

- Colorante vegetal rojo # 2
- Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Sigma
- Agua destilada
- Un ejemplar del 1er prototipo de MIMC
- Un ejemplar del 2do prototipo de MIMC
- Un ejemplar del 3er prototipo de MIMC

## REFERENCIAS DE CAPITULO

- [1] Burriel, F *et. al.* Química Analítica Cualitativa. Editorial Paraninfo. 1988. pp. 486.
- [2] De Santiago, A. Miniaturización, diseño y caracterización de metodologías electroanalíticas y ópticas para el área de Química Farmacéutica Biológica. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2002.

- [3] Ramette, R. W. Equilibrio y análisis químico. Fondo Educativo Interamericano. 1983. pp. 71
- [4] Melon, C. E. y Kiser, R. W. Problemas y experimentos en análisis instrumental. Reveté Mexicana, S. A. México, D. F., 1973. pp 20 – 23.

---

## Determinación cuantitativa de AAS en tabletas de Aspirina<sup>®</sup>

- Elección del filtro de absorción
  - Determinación del intervalo de concentraciones de trabajo por medio de las gráficas de Ringbom
    - Las curvas de calibración ponderadas para estimar errores o límites de confianza
    - Cuantificación de AAS en tabletas de Aspirina<sup>®</sup>
  - Pruebas de significación. Comparación de las medias de dos métodos
- 

*Una de las prácticas obligatorias que debe cumplir la industria farmacéutica es contar con los reportes analíticos del producto en sus distintas etapas. Entre las pruebas analíticas realizadas se encuentra la valoración del fármaco en producto terminado. Para demostrar la funcionalidad de los microfotocolorímetros de mínima instrumentación se retan con una determinación cuantitativa de ácido acetilsalicílico en tabletas de Aspirina<sup>®</sup>:*

Aprovechando la cualidad del AS de formar un compuesto de coordinación colorido con el hierro en su forma catiónica trivalente (ver capítulo 2), se determinará ácido acetilsalicílico en muestras de tabletas con los MIMC's y con un espectrofotómetro convencional. Además, se realizará un análisis estadístico para ver si hay diferencia entre los resultados obtenidos con los dos métodos.

### ELECCIÓN DEL FILTRO DE ABSORCIÓN

Para la elección de la disolución que servirá como filtro se trazó primero el espectro de absorción del complejo AS-Fe. En base a este y al color del complejo (violeta) se eligió una solución de yodo-yodurado 0.045 M como monocromador. Los espectros muestran que la disolución de yodo yodurado aísla la longitud de onda a la cual el complejo AS-Fe tiene su máximo de absorción (520 nm) (Fig. 6.1). El ancho de banda efectivo puede ser muy

grande, pero como se verá en los resultados de los experimentos posteriores el filtro resultó ser bastante efectivo.

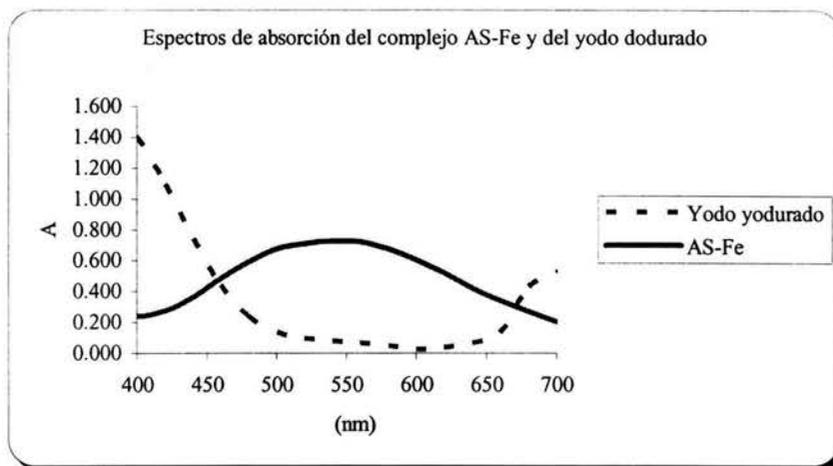


Fig. 6.1. Espectros de absorción del complejo de AS-Fe y Yodo-Yodurado. Nótese que el filtro de yodo yodurado aísla la longitud de onda de absorción máxima del complejo de AS-Fe.

## DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONCENTRACIONES DE TRABAJO POR MEDIO DE LAS GRÁFICAS DE RINGBOM

Como se vio en el capítulo anterior, es muy importante determinar la zona lineal de trabajo para cada analito. Es el turno del AAS y para ello se utilizan las gráficas de Ringbom siguiendo la metodología que a continuación se describe:

En un vaso de precipitados de 50 mL pesar aproximadamente con exactitud 44.0 mg de AS. Adicionar 10 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, adicionar 10 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar al aforo con agua destilada, esta disolución stock tienen una concentración aproximada de 6.37 mM; es muy importante que a partir de este momento el pH del medio se conserve neutro o ligeramente ácido ya que de esto depende la formación de complejo y por lo tanto la generación del color violeta. Tomar alícuotas de 0.07, 0.14, 0.28, 0.58, 0.88, 1.2, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 mL y transferir cada una a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada. Como no se puede hacer más concentrada la disolución stock debido a que se supera la solubilidad máxima del ácido, el resto de las disoluciones se hacen pesando por separado, aproximadamente con exactitud, en vasos de precipitados de 10 mL 8.8, 12.4, 16.6, 19.8, y 23.9 mg de AS, adicionar 4 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, adicionar 4 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada.

Se hacen las mediciones en cada uno de los fotocolorímetros, se determina la transmitancia, la absorbancia para cada muestra y se grafica. Como blanco se utiliza una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M. Las gráficas obtenidas se muestran en la siguiente figura:

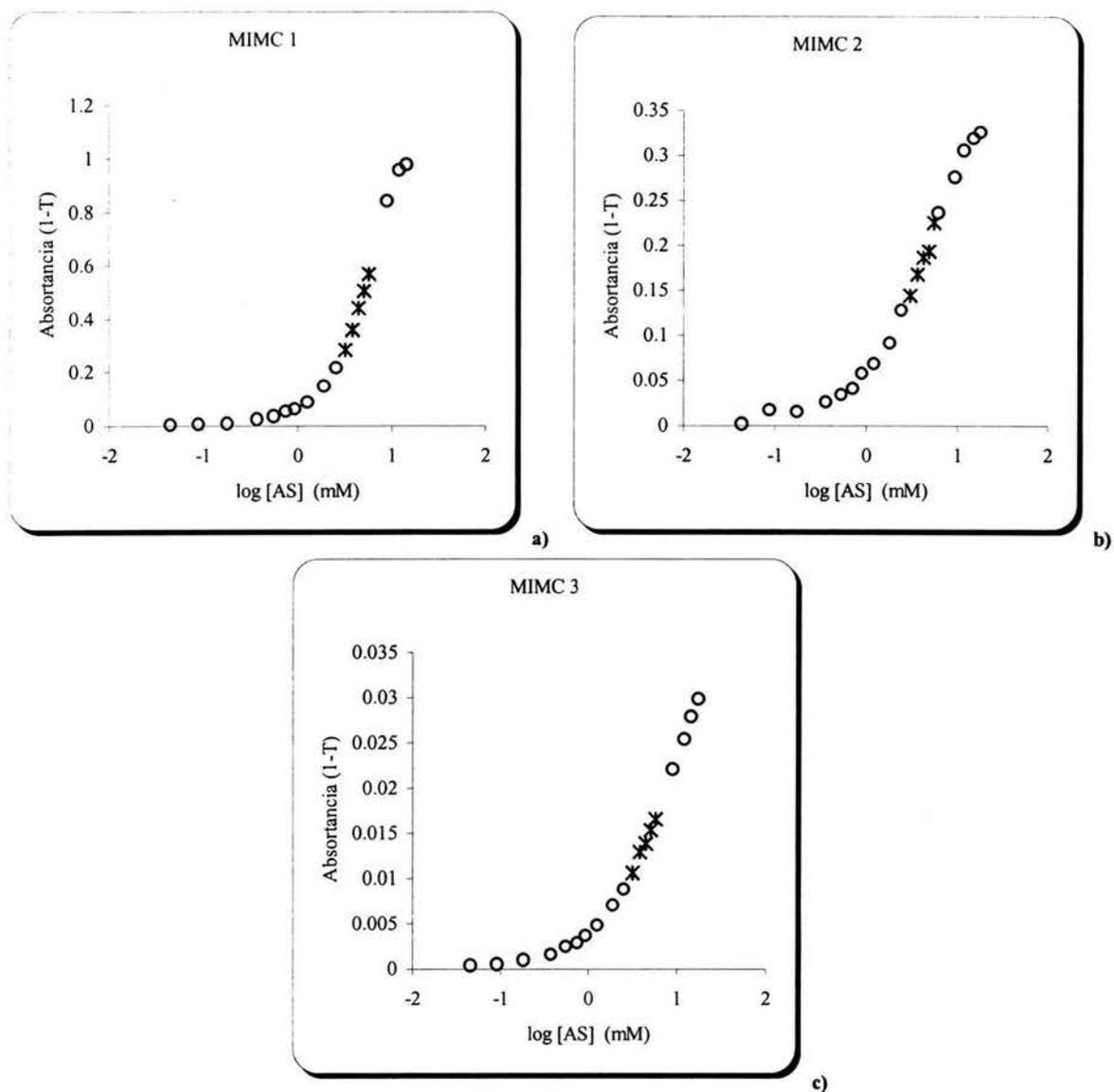


Fig. 6.2. Gráficas de Ringbom con disoluciones de AS-Fe. a) Obtenida con el 1er prototipo de MIMC, b) obtenida con el 2do prototipo c) obtenida con el 3er prototipo. Los puntos marcados con X corresponden a los puntos elegidos como intervalo de trabajo.

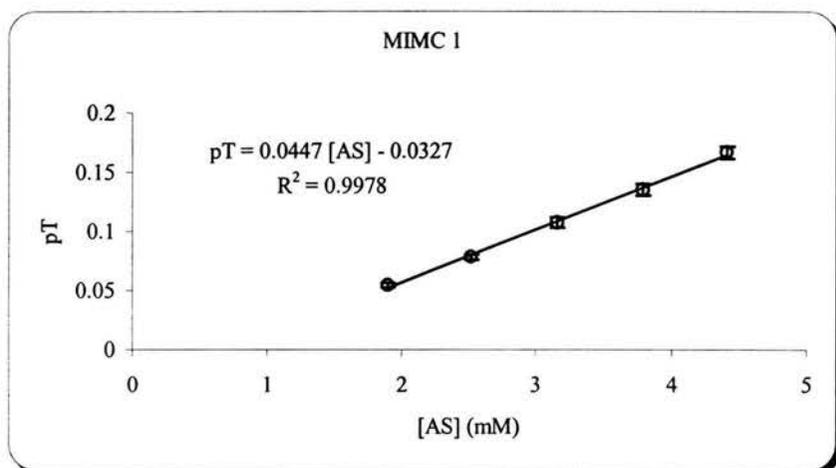
El intervalo de concentraciones de trabajo en el cual la relación respuesta-concentración se comporta linealmente va de 2 mM a 6 mM (Fig. 6.2). Es bajo este intervalo de trabajo que se trazarán las curvas de calibración y se determinará el contenido de AAS en las tabletas de aspirina<sup>®</sup>. El límite de detección se encuentra aproximadamente en 0.35 mM y el de cuantificación aproximadamente por 1.9 mM. Estas condiciones son válidas para los tres microfotocolorímetros.

Por otro lado, en el 1er prototipo se observa que los datos tienden a llegar a una meseta, éste es un caso de saturación que se presenta cuando la respuesta generada es mayor que el valor de la resistencia conectada en paralelo al fotodetector. En el caso del segundo prototipo que también presenta la tendencia a una meseta por saturación, se debe a que se supera la concentración máxima de solubilidad del analito.

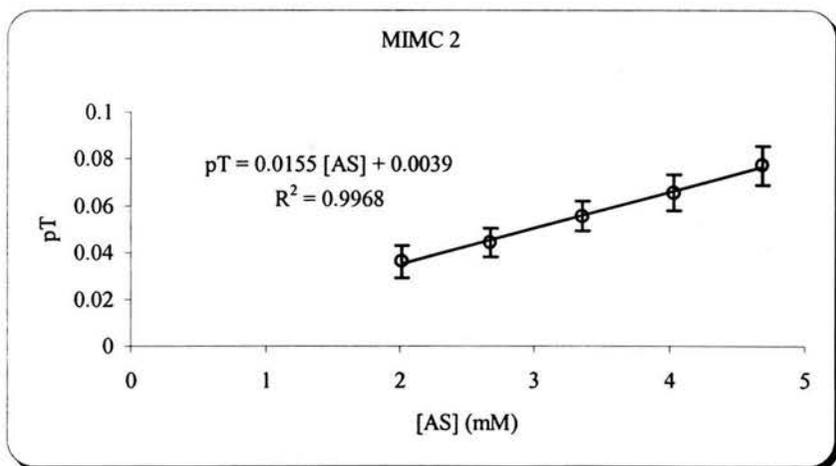
## LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PONDERADAS PARA ESTIMAR ERRORES O LÍMITES DE CONFIANZA

Un químico analítico que utiliza métodos instrumentales no emplea cálculos de regresión simplemente para determinar la pendiente y la ordenada de la grafica de calibración y las concentraciones de muestras problema. También quiere obtener estimaciones de los errores o límites de confianza de esas concentraciones, y en este contexto el método de regresión ponderada proporciona resultados mucho más reales<sup>[1]</sup>.

Entonces, una vez determinadas las concentraciones de AS de trabajo se procede a realizar las curvas de calibración ponderadas con diferentes concentraciones de las disoluciones estándar. Para ello se pesan aproximadamente con exactitud 42.6 mg de AS en un vaso de precipitados de 25 mL, se adicionan 10 mL de NaOH 0.5 M y se disuelve completamente con calentamiento. Se deja enfriar, y posteriormente se agregan 10 mL de HCl 0.5 M, se trasvasa cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y se lleva al aforo con agua destilada; esta disolución stock tiene una concentración de 12.34 mM. De esta disolución se toman alícuotas de 4, 5, 6, 7 y 8 mL y cada una se transfiere a un matraz volumétrico de 10 mL, se adiciona 1 mL de solución de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15 M y se lleva a l aforo con agua destilada. Las curvas de calibración ponderadas obtenidas se muestran en la figura 6.3.



a)



b)

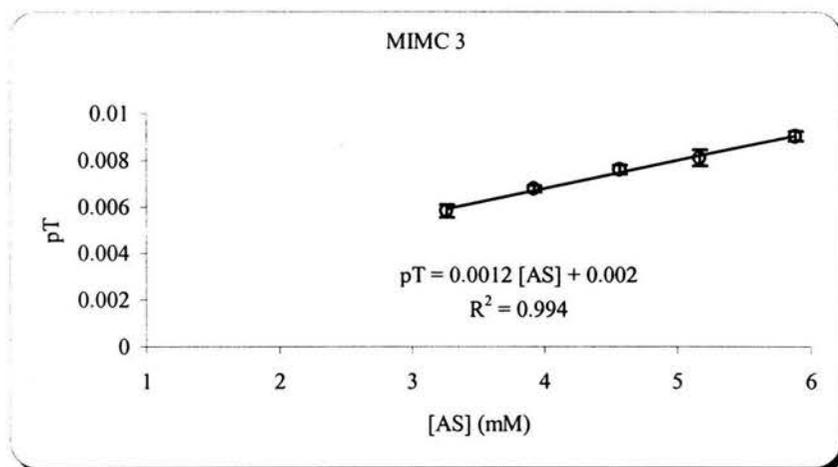


Fig. 6.3. Curvas de calibración ponderadas con disoluciones de AS estándar en concentraciones de 2 a 6 mM. Se muestran las barras de error de las 5 disoluciones estándar que indican la dispersión de la absorbancia obtenida en cada réplica.

Los resultados son muy satisfactorios, todas las gráficas tienen coeficientes de correlación lineal de 0.99 unidades. Para el 1er y 3er prototipo de MIMC se obtienen coeficientes de variación de 1 – 4 %, resultados muy buenos. Pero para continuar la costumbre, con el 2do prototipo de MIMC se obtiene coeficientes de variación de hasta 19 %. En los tres casos son resultados de 10 réplicas.

Otra de las bondades de las curvas de calibración ponderadas es que permiten observar la precisión de la respuesta (pT) a una misma concentración. Por ejemplo, en la figura 6.3b se obtiene un maravilloso coeficiente de correlación lineal, pero sus barras de error para cada una de las concentraciones son muy grandes, lo que nos indica que la dispersión y por lo tanto la precisión de la respuesta con este modelo no es muy buena, situación que ya se esperaba porque durante las mediciones se observó mucha inestabilidad en la lectura del display del multímetro.

Como modelo de referencia de una curva de calibración se traza una en un espectrofotómetro con disoluciones estándar de AS de concentraciones entre 0.1 mM y 0.9 mM. El coeficiente de correlación lineal obtenido ( $r^2 = 0.9996$ ) es comparable con los obtenidos con los MIMC's (Fig. 6.4).

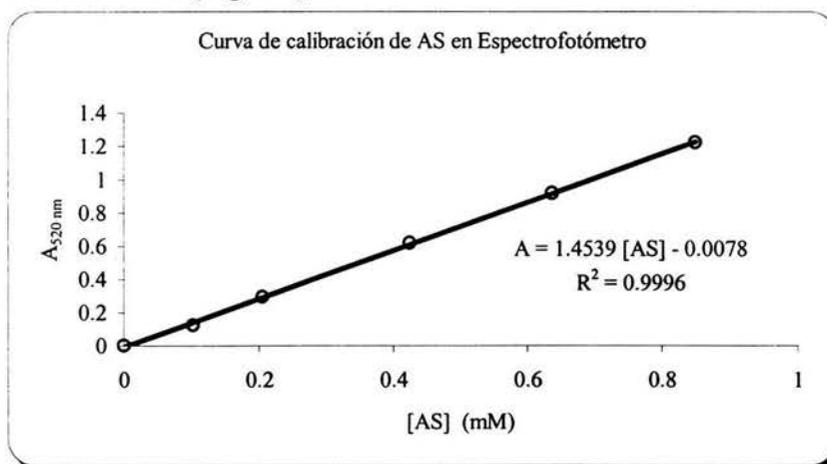


Fig. 6.4. Curva de calibración con soluciones de AS (0.1 mM – 0.9 mM) en un Espectrofotómetro (Espectronic 20).

## CUANTIFICACIÓN DE AAS EN TABLETAS DE ASPIRINA®

Y llegamos ¡por fin! a la prueba de fuego de los equipos. Hasta esta parte los microfotocolorímetros se han comportado de la manera deseada y se espera que lo sigan haciendo. En los experimentos siguientes se pretende cuantificar el ácido acetilsalicílico que contienen las tabletas de aspirina y reportarlo en porcentaje con respecto al marbete, es decir, con respecto a la cantidad reportada en la etiqueta de la caja. Para tal efecto se utilizan tabletas de ácido acetilsalicílico 500 mg, Aspirina de BAYER. Y para no retrasar más el tan esperado momento se comienza con la descripción de la metodología:

### **Metodología**

#### *Preparación de la curva de calibración*

- a) Para curva de calibración del MIMC.  
Se sigue la metodología descrita en las curvas de calibración ponderadas.
- b) Para curva de calibración del espectrofotómetro.

En un vaso de precipitados de 25 mL pesar aproximadamente con exactitud 21.3 mg de AS, adicionar 5 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, adicionar 5 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Tomar alícuotas de 142, 284, 587, 880 y 1174  $\mu\text{L}$  y transferir cada una a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada. Medir la Absorbancia de las disoluciones en el espectrofotómetro utilizando como blanco una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M y una longitud de onda de 520 nm.

#### *Preparación de la muestra*

Determinar el peso promedio de no menos de 10 tabletas. Triturar y micronizar las tabletas en un mortero, y homogenizar; a esta mezcla se le llama “mezcla compuesta”.

- a) Muestra para determinar contenido de AAS utilizando el espectrofotómetro.

En un vaso de precipitados de 25 mL pesar el equivalente a 27.8 mg de AAS de la mezcla compuesta, adicionar 5 mL de NaOH 0.5 M y disolver con calentamiento durante 10 minutos teniendo cuidado de que no se pierda mucho volumen de disolvente durante la evaporación. Dejar enfriar, agregar 5 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Filtrar la disolución anterior por una torunda de algodón. De la solución filtrada tomar una alícuota de 587  $\mu\text{L}$  y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar

al aforo con agua destilada. Medir la Absorbancia de la solución en el espectrofotómetro utilizando como blanco una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M y una longitud de onda de 520 nm.

b) Muestra para determinar contenido de AAS utilizando los MIMC's.

En un vaso de precipitados de 25 mL pesar el equivalente a 27.8 mg de AAS de la mezcla compuesta, adicionar 5 mL de NaOH 0.5 M y disolver con calentamiento durante 10 minutos teniendo cuidado de que no se pierda mucho volumen de disolvente durante la evaporación. Dejar enfriar, agregar 5 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Filtrar la disolución anterior por una torunda de algodón. De la solución filtrada tomar una alícuota de 6 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada. Medir la resistencia residual (respuesta a la poca luz que se filtra, es decir; con la luz apagada). Conectar a la fuente de energía y dejar el foco prendido durante 15 minutos, posteriormente medir la resistencia de las muestras incluyendo un blanco (disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M) en el MIMC utilizado.

## Resultados

Después de hacer las mediciones de las disoluciones estándar y de las muestras problemas (5 réplicas) se obtuvieron los siguientes resultados:

El peso promedio de las tabletas utilizadas en los microfotocolorímetros es 0.59773 g (n = 10) y el de las tabletas utilizadas en el espectrofotómetro 0.59629 g (n = 10).

En la Tabla 6.1 se encuentran las ecuaciones de regresión lineal con sus respectivos coeficientes de correlación lineal, auxiliares en la determinación de las concentraciones de las muestras problema.

Tabla 6.1. Ecuaciones de regresión lineal de las curvas de calibración obtenidos en los MIMC's y el espectrofotómetro.

EQUIPO	Ecuación de regresión lineal	Coefficiente de correlación lineal ( $R^2$ )
MIMC 1	$pT = 0.0136 [AS] + 0.0009$	0.9978
MIMC 2	$pT = 0.0127 [AS] + 0.0028$	0.9733
MIMC 3	$pT = 0.0015 + 9E-05$	0.9969
Espectrofotómetro	$pT = 1.8394 + 0.0152$	0.9994

Los resultados de la cuantificación de AAS en las tabletas de Aspirina por el método espectrofotométrico y el método microfotocolorimétrico se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 6.2. Respuestas de las muestras (kΩ) obtenidas en cada uno de los prototipos de MIMC.

# de muestra	Peso de muestra (g)	Repuesta (kΩ) MIMC 1	Repuesta (kΩ) MIMC 2	Repuesta (kΩ) MIMC 3
Rr		99.6	98.2	420
Ro		6.5	41	2.9
1	0.0342	16.9	48.2	8.2
2	0.0336	16.8	47.7	8.2
3	0.0331	16.7	47.8	8.0
4	0.0328	16.7	47.9	8.1
5	0.0321	16.5	48.2	7.9

El siguiente paso fue calcular los respectivos valores de pT de las muestras problema:

Tabla 6.3. Valores del pT para cada una de las muestras.

# de muestra	pT MIMC 1	pT MIMC 2	pT MIMC 3
1	0.0514	0.0584	0.0056
2	0.0509	0.0541	0.0056
3	0.0504	0.0550	0.0053
4	0.0504	0.0558	0.0054
5	0.0493	0.0584	0.0052

Posteriormente, utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida en la curva de calibración en cada uno de los MIMC's, se determinó la concentración de las muestras con la cual se determinó porcentaje de AAS con respecto al marbete presente en las tabletas de Aspirina. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\%AAS = \frac{C}{1000} * \frac{138.125}{1000} * \frac{10}{6} * \frac{25}{138.125} * \frac{180.16}{pm} * \frac{pp}{pe} * 100$$

Donde:

C: es la concentración de AAS de la muestra determinada con la curva de calibración correspondiente.

pm: Es el peso de la muestra.

pp: es el peso promedio de las tabletas.

pe: es el contenido de AAS especificado en el marbete (0.5 g de AAS por tableta)

A continuación se muestra la tabla con los resultados obtenidos.

**Tabla 6.4. Porcentaje de AAS cuantificado en las tabletas de aspirina. Estos resultados están referidos a la cantidad especificada en el marbete.**

# de muestra	1er prototipo de MIMC	2do prototipo de MIMC	3er prototipo de MIMC
1	97.28	115.11	97.92
2	97.99	108.06	99.67
3	98.43	111.54	97.27
4	99.33	114.42	100.13
5	99.35	122.64	98.29
Media	98.48	114.36	98.66
S <sup>2</sup>	0.8879	5.4027	1.2037
CV %	0.9016	4.7245	1.2201
S	0.7883	29.1892	1.4489

De igual manera, se midió la absorbancia (pT) de cada una de las muestras utilizando el espectrofotómetro y posteriormente se calculó el porcentaje de AAS con respecto al marbete presente en las tabletas de Aspirina. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\%AAS = \frac{C}{1000} * \frac{138.125}{1000} * \frac{10}{0.587} * \frac{25}{138.125} * \frac{180.16}{pm} * \frac{pp}{pe} * 100$$

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 6.5. Absorbancia y % de AAS determinado en cada una de las muestras por el método Espectrofotométrico.**

# de muestra	Peso de muestra (g)	T (%)	pT	% de AAS cuantificado respecto al marbete
1	0.0371	18	0.7447	97.82
2	0.0326	22	0.6576	98.03
3	0.0329	22	0.6576	97.13
4	0.0327	22	0.6576	97.73
5	0.0305	25	0.6021	95.72
			Media	97.29
			S <sup>2</sup>	0.9360
			CV %	0.9621
			S	0.8761

A simple vista parece que no hay diferencias entre los resultados obtenidos con el método microfotocolorimétrico y los obtenidos con el método espectrofotométrico; además, a excepción del segundo modelo, el contenido determinado se encuentran dentro de las especificaciones que marca la FEUM para las tabletas de ácido acetilsalicílico (95.0 % - 105.0 %)<sup>[2]</sup>. Pero no hay que fiarnos del “parece” que siempre resulta ser muy subjetivo, para esto las pruebas de significación son muy efectivas.

## PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN. COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE DOS MÉTODOS <sup>[1]</sup>

La hipótesis nula adoptada es la que la media de los resultados dada por ambos métodos es la misma. Para verificar si las varianzas son homogéneas, que como es sabido es un requisito indispensable para aplicar la prueba de t, se realiza la prueba de  $F$ :

Tabla 6.6. Resultados de la prueba de  $F$ .

Método	Varianza (S)	$F_{\text{experimental}}$	$F_{0.05}$	¿Varianzas Homogéneas?
MIMC 1	0.7883	1.1113	9.605	Si
MIMC 2	29.1892	33.3186	9.605	No
MIMC 3	1.4489	1.6539	9.605	Si
Espectrofotómetro	0.8761	-	-	-

La prueba de t aplicada a los resultados arroja los siguientes resultados:

Tabla 6.7. Resultados de la prueba de  $t$ .

Método	Media	$t_{\text{experimental}}$	$t_{0.05}$	¿Diferencia significativa?
Espectrofotómetro	97.2854	-	-	-
MIMC 1	98.4772	2.0657	2.31	No
MIMC 2	114.3552	6.9611	2.31	Si
MIMC 3	98.6560	2.0099	2.31	No

¿Y cual es el resultado?, pues como se esperaba, el único que muestra diferencia significativa es el 2do prototipo de MIMC, la diferencia es significativa incluso al nivel del 0.1%. Por el contrario, la hipótesis nula se acepta para el MIMC 1 y el MIMC 3.

## MATERIALES Y REACTIVOS DE CAPITULO

- Ácido Salicílico (Baker Analyzed)
- NaOH: Hidróxido de Sodio
- HCl: Ácido Clorhídrico
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : Cloruro de Hierro (ico) (Técnica Química S. A.)
- Agua destilada
- 1 ejemplar del 1er prototipo de MIMC.
- 1ejemplar del 2do prototipo de MIMC
- 1 ejemplar del 3er prototipo de MIMC
- Espectrofotómetro (Espectronic 20)
- Tabletas de ácido acetilsalicílico 500 mg (Aspirina<sup>®</sup> de BAYER).

## REFERENCIAS DE CAPITULO

- [1] Miller, J. C. y Millar, J. N. Estadística para química analítica. 2da. Edición. Addison-Wesley Iberoamericana. Estados Unidos, 1993. pp. 42-43, 47-49 y 110-114.
- [2] SSA. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7<sup>ma</sup> edición. México, 2000. pp1042.

---

## Determinación cuantitativa de glucosa en suero sanguíneo humano

- Elección del filtro de absorción
  - Determinación del intervalo de concentraciones de trabajo por medio de las gráficas de Ringbom
    - Curvas de calibración ponderadas de glucosa en medio enzimático
    - Cuantificación de glucosa en suero sanguíneo
    - Pruebas de significación. La prueba  $t$  por parejas
- 

*Como si no bastaran los resultados obtenidos en la cuantificación de ácido acetilsalicílico para demostrar la funcionalidad de los microfotocolorímetros, se sometieron a un análisis todavía más riguroso, utilizando en esta ocasión una matriz biológica. Decimos que es más riguroso porque se trabaja con un intervalo de concentraciones más reducido, lo que implica que las concentraciones de los estándares utilizados se encuentren muy cercanas. La pregunta es: ¿será el microfotocolorímetro lo suficientemente sensible para detectar los pequeños cambios de concentración de los estándares de la curva de calibración?*

La aplicación de la espectroscopia de absorción en el campo del Químico Farmacéutico Biólogo no es exclusiva de la Industria Farmacéutica; en bioquímica, inmunología, microbiología y bioquímica clínica tiene una basta aplicación. En los laboratorios de análisis clínicos una prueba de rutina que se lleva a cabo es la determinación de glucosa en suero sanguíneo utilizando un método espectrofotométrico; la técnica utiliza un medio enzimático en el que se lleva a cabo la oxidación de la glucosa produciéndose peróxido de hidrogeno que posteriormente dismuta, donde el oxígeno producido reacciona con un receptor cromogénico que da lugar a la formación de un color rojizo; esta propiedad se usa para cuantificar indirectamente a la glucosa presente en la muestra (ver capítulo 2 para mayores referencias).

## ELECCIÓN DEL FILTRO DE ABSORCIÓN

La elección de la disolución que fungirá como filtro de absorción necesita de un paso previo: conocer el espectro de absorción del compuesto cromogénico. El color del filtro utilizado generalmente es complementario al del analito absorbente, en este caso se probaron varias disoluciones de tonos verdes y la que resulto ser más efectiva fue una disolución de un colorante artificial de las que se utilizan en repostería o algunas recetas culinarias (Fig. 7.1). El filtro se prepara tomando 1 gota del colorante concentrado, que es como viene en su presentación comercial, y se diluye llevándola a 50 mL.

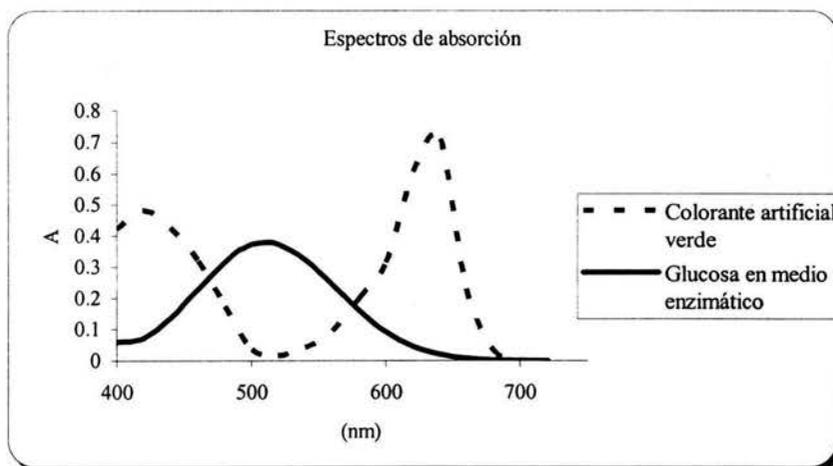


Fig. 7.1. Espectros de absorción del compuesto cromógeno y del colorante verde artificial. Nótese que el filtro verde aísla la longitud de onda máxima de cromógeno (510 nm).

## DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONCENTRACIONES DE TRABAJO POR MEDIO DE LAS GRÁFICAS DE RINGBOM

De la misma manera que con los analitos anteriores, se debe determinar la zona lineal de concentraciones de trabajo con el objetivo de reducir al máximo el error analítico.

Para la generación de los gráficos de Ringbom se lleva a cabo la siguiente metodología: Para fines prácticos se utiliza un kit comercial para la cuantificación de glucosa que contiene el amortiguador de pH (TRIS pH 7.4 92 mM y fenol 0.3 mM), el paquete de enzimas liofilizadas (Glucosa oxidasa (GOD) 15,000 U/L, Peroxidasa (POD) 1000 U/L y 4-aminofenazona 2.6 mM) y el patrón primario acuoso de Glucosa 100 mg/dL o 5.55 mM. Disolver el contenido de un vial con enzimas liofilizadas en un frasco de amortiguador de pH, tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido, a esta disolución le llamaremos reactivo de trabajo (RT). Por otro lado, tomar alícuotas del patrón primario acuoso de glucosa de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120  $\mu$ L y depositar cada una en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad; agregar a cada uno el reactivo de trabajo cbp 1 mL, mezclar e incubar 10 minutos a 37°C ó 30 min. a temperatura ambiente (15 – 25 °C); esta cantidad de muestra es suficiente para hacer las determinaciones en los tres prototipos de MIMC. Transcurrido el tiempo de incubación hacer las mediciones en cada uno de los microfotocolorímetros, determinar la transmitancia, la absortancia y

graficar. Como blanco se utiliza el reactivo de trabajo (RT). Recordar que se tiene que enjuagar entre cada medición con la disolución siguiente en el orden de concentración de menor a mayor.

Las graficas de Ringbom resultantes son las siguientes:

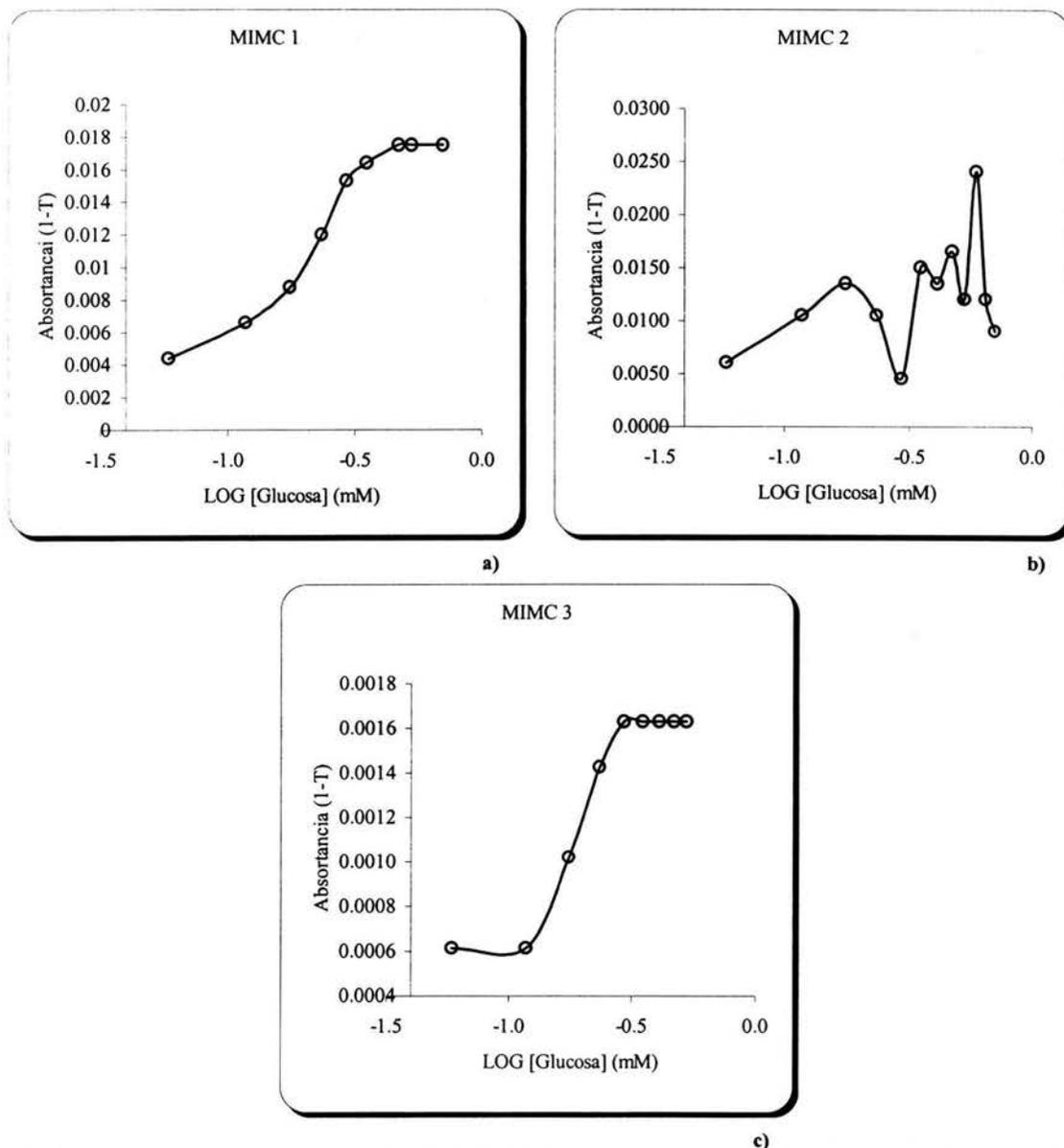


Fig. 7.2. Gráficas de Ringbom con disoluciones de glucosa en medio enzimático. a) Obtenida con el 1er prototipo de MIMC, b) obtenida con el 2do prototipo y c) obtenida con el 3er prototipo.

El intervalo de concentraciones de trabajo para el MIMC 1 y el 3 en el cual la relación absorbancia-concentración se comporta de manera lineal va de 0.12 a 0.30 mM; un intervalo bastante pequeño que a penas permitirá una diferencia de concentración entre una disolución estándar y otra de 0.036 mM. Para el MIMC 2 no se puede determinar esta zona; las variaciones por el ruido del aparatito son mayores que la respuesta generada por las disoluciones estándar, se ha llegado al límite de sus capacidades y no se puede exigir más,

pero a pesar de esto también se someterá a los experimentos siguientes con la finalidad de monitorear su comportamiento utilizando el intervalo de concentraciones determinado para los otros MIMC's.

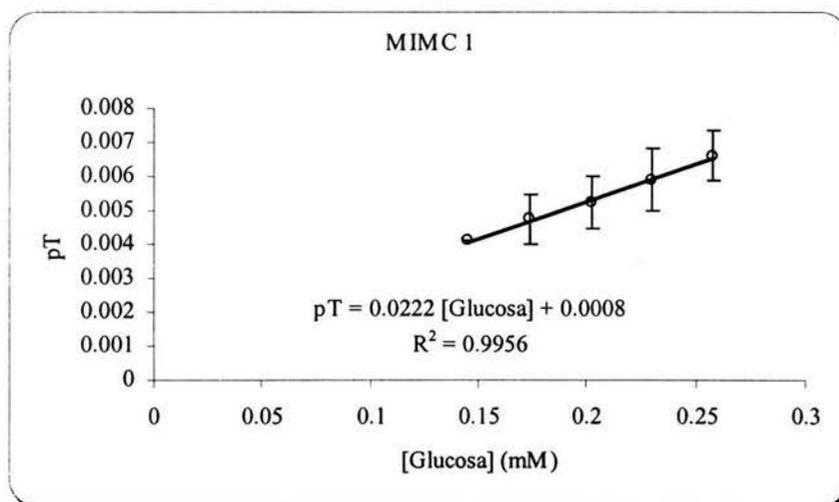
Se observa que tanto en la figura 7.2a como en la 7.2c se llega a una meseta a partir de 0.3 mM, esta es una saturación por reactivo limitante. El fenol, que forma parte en la reacción del peróxido con la 4-aminofenazona para la formación del compuesto cromogénico (quinona), es el que limita la reacción que justamente tiene una concentración de 0.3 mM.

## CURVAS DE CALIBRACIÓN PONDERADAS DE GLUCOSA EN MEDIO ENZIMÁTICO

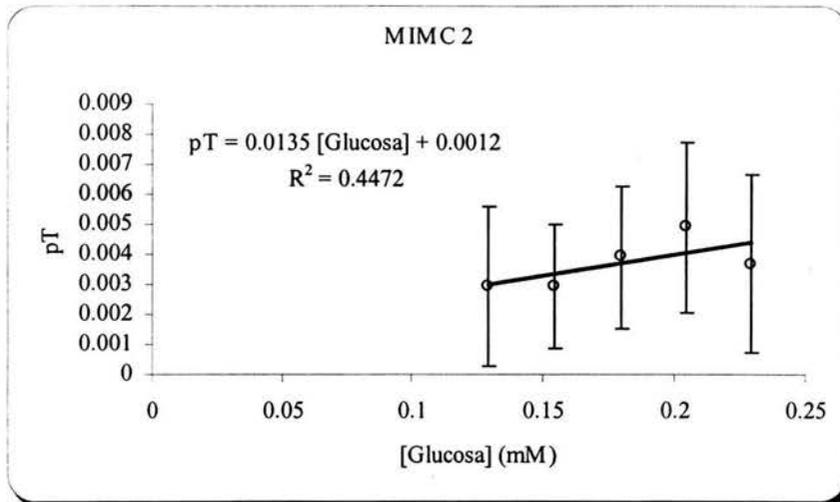
La información que se obtiene con el uso de las curvas de calibración ponderadas ya ha sido discutida ampliamente en el capítulo anterior.

Por las mismas razones se trazan las curvas de calibración ponderadas utilizando el intervalo de concentraciones de trabajo determinado con las gráficas de Ringbom. La técnica es la siguiente: Preparar el reactivo de trabajo como se describió para las gráficas de Ringbom. Tomar alícuotas de 175, 210, 245, 280 y 315  $\mu\text{L}$  del patrón primario acuoso de glucosa y depositar cada una en un tubo eppendorf de 10 mL de capacidad; agregar a cada uno el reactivo de trabajo cbp 7 mL, mezclar e incubar 10 minutos a 37 °C ó 30 min. a temperatura ambiente (15 – 25 °C); esta cantidad de muestra es suficiente para hacer las determinaciones en los tres prototipos de MIMC (10 réplicas por equipo). Transcurrido el tiempo de incubación, hacer las mediciones en cada uno de los microfotocolorímetros, determinar la transmitancia, la absorbancia y graficar. Como blanco se utiliza el reactivo de trabajo (RT). Recordar que se tiene que enjuagar entre cada medición con la disolución siguiente en el orden de concentración de menor a mayor.

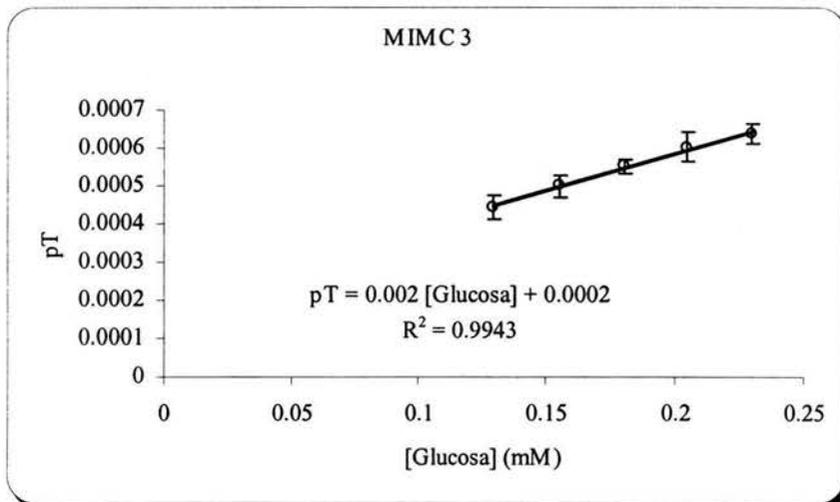
Las curvas de calibración ponderadas obtenidas son las siguientes:



a)



b)



c)

Fig. 7.3. Curvas de calibración ponderadas con disoluciones de glucosa en medio enzimático. Se muestran las barras de error de las 5 disoluciones estándar que indican la dispersión de la absorbancia obtenida en cada réplica (n = 10).

Ahora sí los resultados son muy variados. Para el MIMC 1 se obtiene un coeficiente de correlación lineal muy bueno: de 0.9956 unidades, pero sus barras de error son relativamente grandes que se ve reflejado en los valores de los coeficientes de variación que van de 9 a 17 %.

Las palabras sobran al tratar de describir el resultado obtenido con el 2do prototipo, no es una línea recta lo que se obtiene, la imprecisión y dispersión de los datos son muy grandes, y los coeficientes de variación, ni se diga, tienen valores que casi llegan al 100 por ciento (57 – 90 %)

Esta dispersión se da principalmente por la variación del voltaje que provoca una variación de la intensidad de luz emitida por el foco y en consecuencia una gran variación de la lectura del multímetro.

El tercer modelo es el que mejor se comporta, se obtiene un buen coeficiente de correlación lineal y un error pequeño. Sus coeficientes de variación siguen conservando valores pequeños: del 3 al 5 %.

## **CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO SANGUÍNEO**

Los resultados obtenidos en la parte anterior tendrán un inevitable efecto sobre los experimentos siguientes.

En esta cuantificación, a diferencia del análisis de AAS, no se hace curva de calibración, sólo se utiliza una disolución estándar y una muestra. Se ha decidido hacer el experimento de esta manera porque la técnica convencional así lo indica y para que no haya desviaciones por el método utilizado.

### **Metodología**

#### *Preparación de estándares de referencia:*

- a) Para espectrofotómetro: Preparar el reactivo de trabajo como se describió para las gráficas de Ringbom. Tomar una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del patrón primario acuoso de glucosa y depositar en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad; agregar 1 mL del RT, mezclar e incubar 10 min. a 37 °C o 30 min. a temperatura ambiente (15 – 25 °C). Transcurrido el tiempo de incubación hacer la medición de la transmitancia o la absorbancia. Como blanco utilizar el RT.
- b) Para microfotocolorímetro: Tomar 35  $\mu\text{L}$  del patrón primario acuoso de glucosa y depositar en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad; agregar 1 mL de RT, mezclar e incubar; esta cantidad es suficiente para hacer las determinaciones en los tres prototipos de microfotocolorímetros. Transcurrido el tiempo de incubación hacer las mediciones en cada uno de los MIMC's, determinar la transmitancia y el pT. Utilizar como blanco el RT.

#### *Toma de muestra y tratamiento de muestra:*

Antes que todo, el lugar en donde se hará la toma de muestra debe estar limpio y desinfectado y debe ser cómodo para el paciente. El personal debe portar bata blanca y limpia. El paciente debe tener mínimo 4 horas de ayuno.

Primero, el personal que vaya a tomar la muestra debe lavarse las manos perfectamente con agua y jabón, y secarlas con una toallita de papel desechable. Antes de todo, se debe tranquilizar al paciente, esto facilitará la toma de muestra; posteriormente se observa y se palpa la zona de punción con el objetivo de ubicar la posición y la dirección de la vena, la zona de elección siempre es la parte anterior al codo justo donde se dobla, ya que es la menos inervada y por lo tanto dolerá menos; si no se observa la vena se puede hacer uso de

la ligadura que se coloca a aproximadamente 8 cm de la zona de punción, una vez localizada quitar la ligadura. Posteriormente limpiar la zona con una torunda de algodón y alcohol al 96 % ya sea pasando la torunda de arriba hacia abajo dibujando líneas verticales sin volver a pasar por el mismo sitio o bien, utilizando la técnica del espiral empezando del centro hacia afuera dibujando una espiral, si es necesario, repetir la operación. Mientras el poco alcohol que quedó en el brazo se evapora se coloca de nuevo la ligadura y se indica al paciente que cierre y abra la mano, mientras lo hace, sin abrir sobre, se checa que el émbolo de la jeringa funcione correctamente, luego, se saca la jeringa y se coloca la aguja en su lugar y se asegura que esta bien puesta, esta operación se debe hacer rápidamente ya que la ligadura no puede permanecer mucho tiempo en el brazo. El paciente relaja la mano y se hace la punción en el sitio desinfectado con el bisel de la aguja hacia arriba y en un ángulo de 40°, se extrae un poco el émbolo para verificar que se esta en vena y se quita inmediatamente la ligadura, se extrae el volumen de sangre deseado y antes de sacar la aguja se coloca una torunda limpia de algodón humedecida con alcohol sobre el sitio de punción y se retira la aguja.

La aguja se tapa con su cubierta y se retira, el contenido de la jeringa se vacía a un tubo de ensayo limpio. Es muy importante retirar la aguja antes de vaciar el contenido de la jeringa, de lo contrario habrá hemólisis que interferirá en nuestro análisis.

Centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 10 min. Transcurrido esta tiempo, separar lo antes posible el suero del coágulo.

#### *Preparación de muestra*

- a) Para espectrofotómetro: Tomar una alícuota de 10 µL de suero y depositar en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad; agregar 1 mL de RT, mezclar e incubar 10 min. a 37 °C o 30 min. a temperatura ambiente (15 – 25 °C). Transcurrido el tiempo de incubación hacer las mediciones de transmitancia o absorbancia. Como blanco utilizar el RT. Aplicar la siguiente ecuación para determinar la concentración de la muestra:

$$C_m = \frac{pT_m \times C_{STD}}{pT_{STD}}$$

Donde:

$C_m$  es la concentración de la muestra

$pT_m$  es la absorbancia de la muestra

$C_{STD}$  es la concentración del patrón primario acuoso de glucosa, o sea, 100 mg/dL

$pT_{STD}$  es la absorbancia del estándar o patrón primario acuoso de glucosa.

- b) Para microfotocolorímetro: Tomar 35 µL de suero y depositar en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad; agregar 1 mL de RT, mezclar e incubar; esta cantidad es suficiente para hacer las determinaciones en los tres prototipos de microfotocolorímetros. Transcurrido el tiempo de incubación hacer las mediciones

en cada uno de los MIMC's, determinar la transmitancia y el pT. Utilizar como blanco el RT. De igual manera, la concentración de glucosa en las muestras se calcula con la ecuación:

$$C_m = \frac{pT_m \times C_{STD}}{pT_{STD}} \dots\dots\dots(1)$$

## Resultados

Después de realizar las mediciones correspondientes se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 7.1. Respuestas de las muestras en cada uno de los equipos.

Tipo de respuesta	Espectrofotómetro Absorbancia	MIMC 1 Respuesta (KΩ)	MIMC 2 Respuesta (KΩ)	MIMC 3 Respuesta (KΩ)
<b>Día 1</b>				
R <sub>r</sub>	NA	99.6	- <sup>*</sup>	741
R <sub>0</sub>	NA	11.4	- <sup>*</sup>	1.22
R <sub>std</sub>	0.376	12.6	- <sup>*</sup>	1.57
R <sub>muestra 1</sub>	0.314	12.1	- <sup>*</sup>	1.52
R <sub>muestra 2</sub>	0.336	12.5	- <sup>*</sup>	1.53
<b>Día 2</b>				
R <sub>r</sub>	NA	99.8	98.3	1750
R <sub>0</sub>	NA	8.27	37.6	4.35
R <sub>std</sub>	0.376	9.81	39.1	5.52
R <sub>muestra 3</sub>	0.291	9.46	38.8	5.32
R <sub>muestra 4</sub>	0.278	9.43	38.7	5.24
<b>Día 3</b>				
R <sub>r</sub>	NA	100.1	98.2	888
R <sub>0</sub>	NA	8.3	40.1	3.48
R <sub>std</sub>	0.378	9.41	41.1	4.59
R <sub>muestra 5</sub>	0.326	9.40	40.6	4.43
R <sub>muestra 6</sub>	0.280	9.44	41	4.39
<b>Día 4</b>				
R <sub>r</sub>	NA	100.4	98.3	730
R <sub>0</sub>	NA	9.3	39.4	3.35
R <sub>std</sub>	0.366	9.68	10	4.66
R <sub>muestra 7</sub>	0.315	9.63	39.9	4.56
R <sub>muestra 8</sub>	0.278	9.58	39.6	4.34

Calculando el pT para cada muestra y posteriormente con la ecuación (1) su concentración se determinan los resultados siguientes:

Tabla 7.2. Concentraciones de glucosa determinadas en cada uno de los equipos.

Voluntario	Espectrofotómetro Concentración de Glucosa (mg/dL)	MIMC 1 Concentración de glucosa (mg/dL)	MIMC 2 Concentración de glucosa (mg/dL)	MIMC 3 Concentración de glucosa (mg/dL)
1	83.51	58.17	-*	85.71
2	89.36	91.61	-*	88.57
3	77.39	77.12	79.8	82.90
4	73.94	75.17	73.09	76.06
5	86.24	99.09	49.78	85.58
6	74.07	102.72	89.92	81.97
7	86.07	86.88	83.26	92.15
8	75.96	73.64	33.22	75.56

Como se predijo al inicio de esta sección, los resultados obtenidos en las curvas de calibración ponderadas y en las gráficas de Ringbom tuvieron un efecto significativo sobre la cuantificación de glucosa en suero sanguíneo humano, principalmente en los obtenidos con el segundo prototipo de MIMC. Entonces surge una pregunta: ¿Qué tan grande es la diferencia? Para darle respuesta se hace un análisis estadístico de los datos obtenidos.

### **PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN. LA PRUEBA *t* POR PAREJAS**

Para este tipo de estudios, en los que las muestras contienen, de manera sustancial, diferentes cantidades de analito la prueba de *t* por parejas resulta ser la apropiada. Esta consiste en observar las diferencias entre cada par de resultados dados por los dos métodos<sup>[1]</sup>.

Adoptando la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas en las concentraciones dadas por los dos métodos, se puede probar si la media de las diferencias difiere significativamente de cero:

Se determinan las diferencias entre cada método y posteriormente se aplica la siguiente ecuación:

$$t = \bar{x} \frac{\sqrt{n}}{S_d}$$

☆ Nota: Tanto en la tabla 7.1 como en la 7.2 no aparecen dos datos para el MIMC 2, esto porque, tomando en cuenta los antecedentes que se tenían del comportamiento del prototipo en esta parte, se había tomado la decisión de no realizar la cuantificación de glucosa en suero con este modelo, pero a partir de la muestra 3 se cambió de parecer.

Donde  $\bar{x}$  es la media de las diferencias,  $n$  el número de muestras y  $S_d$  la desviación estándar de las diferencias. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7.3. Resultados del análisis estadístico por la prueba de  $t$  por parejas.

Muestra	Diferencia entre Espectrofotómetro y MIMC 1	Diferencia entre Espectrofotómetro y MIMC 2	Diferencia entre Espectrofotómetro y MIMC 3
1	25.34	-	-2.2
2	-2.25	-	0.79
3	0.27	-2.41	-5.51
4	-1.23	0.85	-2.12
5	-12.85	40.46	0.66
6	-28.65	-15.85	-7.9
7	-0.81	2.81	-6.08
8	2.32	42.74	0.4
Media	-2.2325	11.4333	-2.745
$S^2$	15.1227	24.2695	3.3808
$t_{\text{experimental}}$	-0.42	1.15	-2.30
$t_{0.05}$	2.36	2.57	2.36
¿Diferencia significativa?	No	No	No

Pues verdadera sorpresa es con la que nos encontramos, según la prueba de significación utilizada no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el espectrofotómetro y los microfotocolorímetros.

## MATERIALES Y REACTIVOS DE CAPITULO

- Kit para la determinación cuantitativa de glucosa. Glucosa Trinder-GOD-POD. (SPINREACT S. A.)
- Glucosa Anhidra (Técnica Química, S. A.)
- Agua destilada
- 1 ejemplar del 1er prototipo de MIMC
- 1 ejemplar del 2do prototipo de MIMC
- 1 ejemplar del 3er prototipo de MIMC
- Espectrofotómetro (TURNER)
- Tubos eppendorf 2 mL
- Muestras de sangre humana.
- Jeringas hipodérmicas estériles

- Algodón
- Alcohol
- Centrífuga

## REFERENCIAS DE CAPITULO

- [1] Miller, J. C. y Millar, J. N. Estadística para química analítica. 2da. Edición. Addison-Wesley Iberoamericana. Estados Unidos, 1993. pp. 44-46.

---

## Otras aplicaciones

- Curvas de calibración de I<sub>2</sub>-I con MIMC 1
  - Curvas de calibración de proteínas con reactivo de Biuret y MIMC 2
  - Valoraciones volumétricas con detección óptica del volumen de punto final
- 

*Ha pasado algo de tiempo desde que se probaron por primera vez los microfotocolorímetros, y mientras se preparaban los experimentos y resultados del tema que nos ocupa, otros trabajos eran realizados con estos mismos aparatitos, y de igual manera, con resultados muy satisfactorios.*

Como ya hemos visto, cualquier analito que presente características coloridas puede analizarse microfotocolorimétricamente. Los equipos presentan una gran versatilidad, tanta que hasta se construyó uno para valoraciones volumétricas con detección óptica del volumen de punto final.

### CURVAS DE CALIBRACIÓN DE I<sub>2</sub>-I CON MIMC 1 <sup>[1]</sup>

El yodo, casi insoluble en agua, se solubiliza adicionando iones yoduro en forma de sal al medio por la formación del ión triyoduro I<sub>3</sub><sup>-</sup>. Este ión forma disoluciones de un color café intenso incluso a concentraciones muy bajas; es entonces susceptible de ser medido microfotocolorimétricamente. Se hizo una disolución stock de yodo-yodurado 0.5 M, adicionando 10Co de Yoduro de Potasio. Se hicieron las respectivas diluciones para tener concentraciones de 5, 7.5, 10, 15 y 17.5 mM. Como blanco se utilizó agua destilada. La gráfica que se muestra en la Fig. 8.1 corresponde a una de tantas que se obtuvieron con éste sistema. El microfotocolorímetro utilizado era un ejemplar del 1er prototipo.

Como filtro de absorción se utilizó una disolución de una aspirina sometida a un poco de calentamiento para la hidrólisis del éster del ácido acetilsalicílico a la que después se le agregó un granito de cloruro férrico. Fue de este rudimentario filtro de donde surgió la idea de la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas por este método.

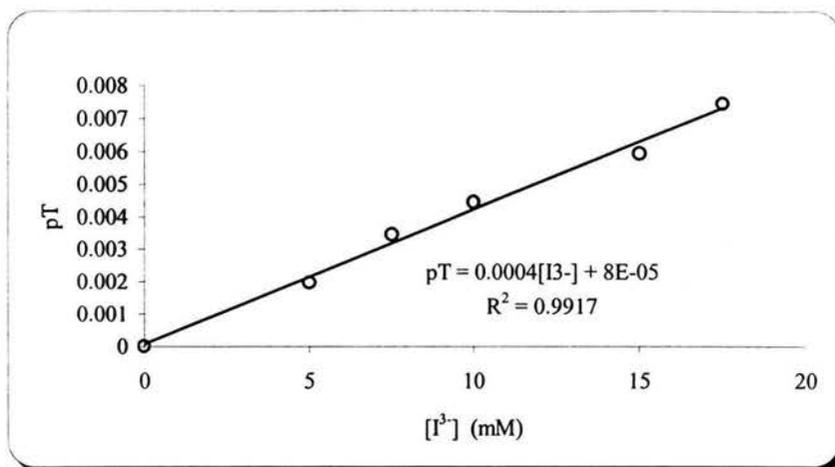


Fig. 8.1. Curva de calibración con disoluciones estándar de yodo-yodurado.

El coeficiente de correlación lineal es muy bueno, de 0.9917, nada mal para ser de los primeros ensayos con los microfotocolorímetros.

## CURVAS DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNAS CON REATIVO DE BIURET Y MIMC 2 <sup>[2]</sup>

La cuantificación de proteínas es una práctica muy frecuente en la industria de los alimentos principalmente, y generalmente se utiliza la espectrofotometría como método de análisis. Por otro lado, una parte importante de la mayoría de las investigaciones incluyen la cuantificación de proteínas. El reactivo de Biuret se utiliza para generar una coloración violeta al reaccionar con las proteínas, este color es resultado de la formación de un complejo de cobre con los grupos aminos de las proteínas <sup>[3]</sup>. En base a esto se realizó una curva de calibración utilizando un stock de albúmina sérica bovina al 4 % en PBS pH = 7.4, tomando alícuotas de 20, 40, 80, 120 y 140  $\mu\text{L}$  y se le adiciona NaCl 0.9 % cbp 360  $\mu\text{L}$ . Posteriormente se agregan 440  $\mu\text{L}$  del reactivo de Biuret y 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. El reactivo de Biuret se prepara con 4.325 g de citrato de sodio, 2.5 g de carbonato de sodio, 0.4325 g de nitrato de cobre y agua destilada cbp 25 mL.

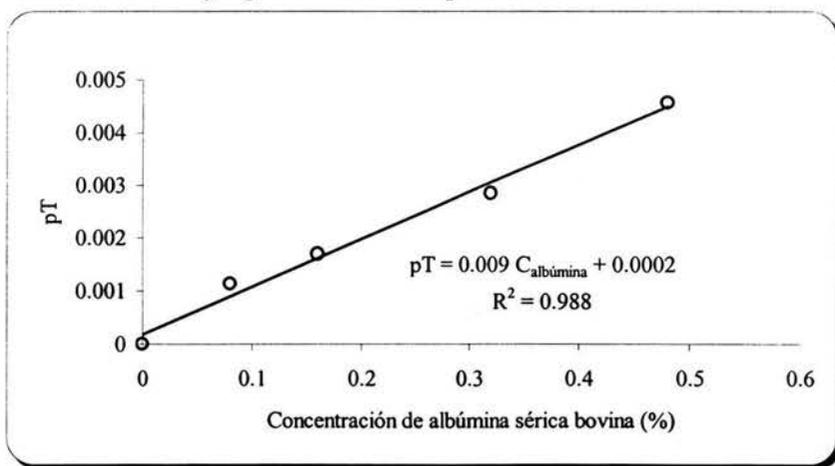


Fig. 8.2. Curva de calibración de albúmina sérica bovina a diferente concentración.

Como filtro se utilizó una disolución de Nitrato de Níquel 0.5 M, el cuál aísla la longitud de onda máxima de absorción de la coloración producida por la reacción de las proteínas con el reactivo de Biuret (540 nm). Ver apéndice A.

Una de las curvas de calibración obtenidas es la que se muestra en la figura 8.2. El coeficiente de correlación lineal obtenido es excelente considerando que estos resultados se obtuvieron con el segundo prototipo de MIMC.

Cabe mencionar que se obtuvieron muchas gráficas con los mismos resultados.

### VALORACIONES VOLUMÉTRICAS CON DETECCIÓN ÓPTICA DEL VOLUMEN DE PUNTO FINAL<sup>[4]</sup>

Una de las variantes de los fotocolorimetritos fue un novedoso e ingenioso microtitulador volumétrico con detección óptica del volumen de punto final (vpf). Su construcción también estuvo basada en el esquema lineal de la instrumentación óptica. De igual manera, se hizo con acrílico pintado de negro, el filtro de absorción consistió en una placa de plástico transparente pintado de azul y la celda en un pequeño vaso de precipitados de vidrio de 10 mL (Fig. 8.3). Todo el sistema se adaptó a una microbureta de 2 mL y a un microagitador.

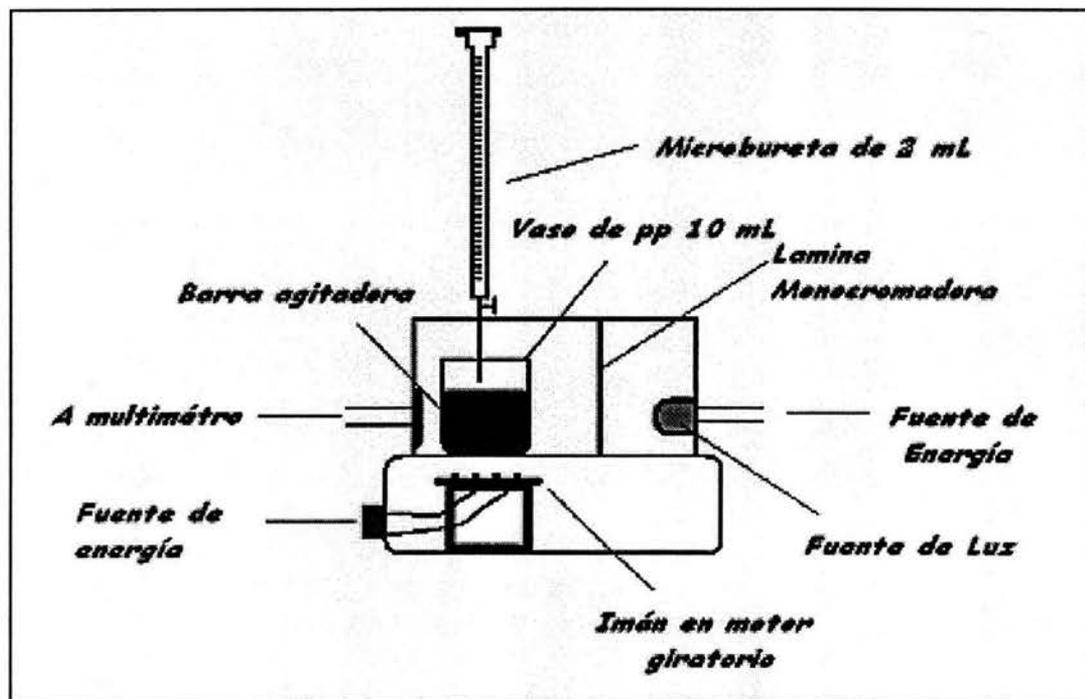


Fig. 8.3. Esquema de un microtitulador volumétrico con detección óptica del vpf.

La prueba consistió en una valoración volumétrica de 1 mL de HCL de concentración nominal 0.1 F con NaOH 0.1 F, utilizando como indicador visual 1 gota de fenolftaleína. A cada volumen adicionado se tomaba la lectura correspondiente. Una de las curvas de valoración obtenidas fue la siguiente:

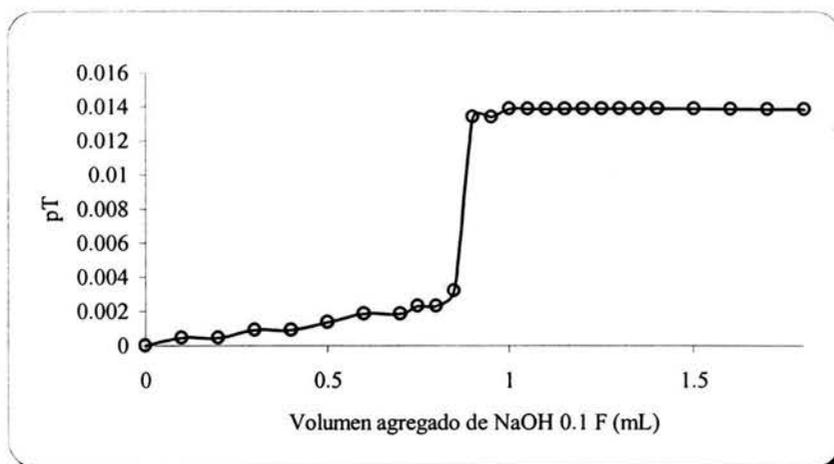


Fig. 8.4. Curva de valoración volumétrica de HCl con NaOH 0.1 F con detección óptica del volumen de punto final. Se utiliza fenolftaleína como indicador.

El volumen de punto final de la valoración se determinó utilizando el método algebraico de la 1ra derivada (Fig. 8.5), el resultado fue un vpf = 0.875 mL de NaOH 0.1 F, por lo tanto, la concentración real del HCl es de 0.0875 F.

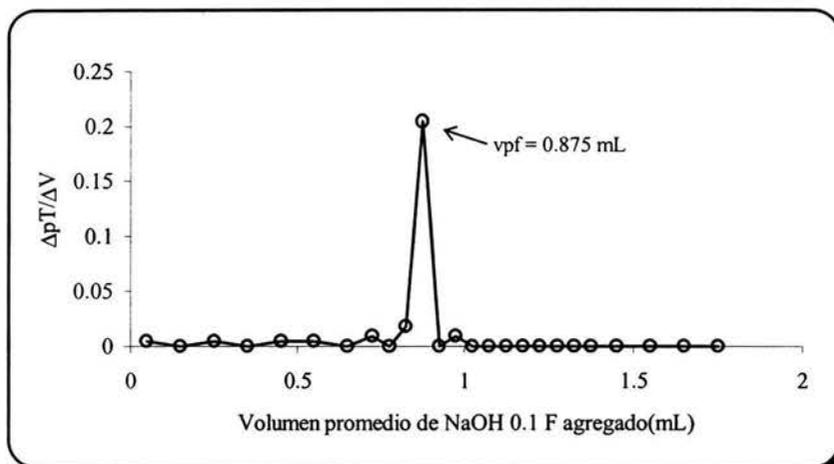


Fig. 8.5. Primera derivada para determinar el vpf de la valoración.

Como se ve, este microtitulador funcionó de maravilla y lo mejor del caso es que el costo total del sistema es muy bajo. En el mercado hay tituladores que funcionan bajo este principio, pero son muy costosos.

## MATERIALES Y REACTIVOS DE CAPITULO

- Yodo ( $I_2$ )
- Yoduro de potasio (KI)

- Agua destilada
- Tabletas de aspirina 500 mg.
- Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- Albúmina sérica bovina
- PBS pH = 7.4
- NaCl
- NaOH
- Citrato de sodio
- Carbonato de sodio
- Nitrato de cobre
- Nitrato de níquel
- HCL
- Fenolftaleína
- 1 ejemplar del 1er prototipo de MIMC
- 1 ejemplar del 2do prototipo de MIMC
- 1 ejemplar del microtitulador volumétrico.

## REFERENCIAS DE CAPITULO

- [1] Juan Manuel Martínez. Trabajo realizado durante el programa “Estancias Cortas de Investigación”. Facultad de Química, UNAM. Marzo, 2002.
- [2] Xochiquetzal González. Trabajo realizado durante el programa “Estancias Cortas de Investigación”. Facultad de Química, UNAM. Julio, 2003.
- [3] Rendina, George. Técnicas de Bioquímica Aplicada. Nueva Editorial Interamericana. México. México, 1974. pp. 61 – 63.
- [4] Juan Manuel Martínez. Trabajo realizado durante el programa “Estancias Cortas de Investigación”. Facultad de Química, UNAM. Mayo, 2001.



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

---

Después de haber visto todos los resultados obtenidos y el comportamiento de los microfotocolorímetros a lo largo de éste trabajo se llega a las siguientes conclusiones:

- Se construyeron equipos para el análisis óptico con materiales de fácil acceso y bajo precio con los que se obtuvieron resultados con linealidad, precisión y reproducibilidad aceptables y comparables con los obtenidos con un espectrofotómetro comercial.
- El único microfotocolorímetro que presentó problemas fue el segundo prototipo. El problema radica en el diámetro del capilar que es muy pequeño; esto provoca dos cosas: la primera es que al ser tan angosto el volumen de disolución que hay en el paso óptico es muy poco, por lo que la absorción no es suficiente como para provocar una disminución en la luz incidente y sucede principalmente cuando se trabaja a bajas concentraciones de analito. El segundo es que debido a su tamaño la luz que incide sobre el capilar pasa de largo por los lados absorbiéndose una mínima cantidad. Este problema puede solucionarse aumentando el diámetro del capilar, pero esto implicaría el uso de un volumen mayor de muestra y recordemos que un objetivo inherente de este trabajo es reducir la cantidad de residuos.
- Uno de los principales problemas que se presenta en los tres prototipos es la variación de la intensidad de radiación emitida por el foco debido a la inestabilidad del voltaje de entrada al sistema. Esto se ve principalmente en el experimento de la glucosa en el que los coeficientes de variación, el error relativo y la dispersión de los datos fueron muy grandes, principalmente en el 1er y 2do prototipos.
- Otro problema que se presenta es el bajo incremento que hay en la respuesta de una disolución de determinada concentración a otra de concentración mayor, al menos que la diferencia de concentraciones sea muy grande. El problema se debe a que la fotorresistencia presenta una relativa baja sensibilidad.
- La aplicación de los microfotocolorímetros es múltiple, especialmente dentro de las prácticas de campo, ya que debido a su tamaño pueden llevarse a cualquier parte en donde se requiera hacer un análisis, además ofrecen una gran ventaja cuando las muestras son susceptibles a cambios y degradación durante el traslado de la misma desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, porque el análisis se puede hacer en el mismo sitio.

## CONCLUSIONES

- El volumen utilizado de disolución estándar o muestra (apenas de 200  $\mu\text{L}$ ) es muy pequeño comparado con los 3 o 5 mL utilizados en los espectrofotómetros. Esto implica entonces una disminución significativa de los reactivos utilizados, una reducción de los costos en cada análisis, y una reducción de residuos y contaminantes.
- Es además, desde el punto de vista docente, una alternativa para las prácticas de laboratorio de análisis porque permite conocer al educando el fundamento de los métodos ópticos de análisis, ya que el alumno puede construir su propio equipo. Por otro lado se crea una conciencia ecológica y de ahorro en los alumnos.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



En el presente trabajo se han puesto en evidencia una gran cantidad de buenos resultados, pero también las deficiencias de los equipos; aunque yo no les llamaría precisamente así, al contrario, las considero páginas abiertas y la oportunidad para que otros puedan continuar y contribuir a mejorar éste trabajo. De acuerdo a esto se han planteado las siguientes perspectivas:

- Buscar la forma de inhibir la inestabilidad del voltaje de entrada que siempre ha representado uno de los mayores problemas de los equipos, por la variabilidad de la luz y de la lectura del multímetro que esto ocasiona. Se ha pensado en conectar un pequeño diodo Zener en serie con el foco, el cual proporcionara un paso de voltaje constante al foco. Esto sin duda disminuirá las barras de error y los coeficientes de variación en las curvas de calibración ponderadas y mejorará, aún más, la reproducibilidad de los datos
- Hallar la manera de aumentar la distancia numérica entre la respuesta obtenida a un valor de concentración y otro, esto aumentará la sensibilidad del microfotocolorímetro y podrá detectar pequeños cambios de concentración de analito. Todavía no tenemos idea de cómo solucionarlo pero esperamos encontrarla pronto.
- Aplicar el segundo prototipo de MIMC como celda de flujo continuo, algo muy similar a la detección por ultravioleta o visible de los compuestos separados en cromatografía de líquidos de alta eficiencia.
- Miniaturizar aún más los equipos con la finalidad de que ocupen menos espacio y su transporte sea más fácil, y para que se utilice un menor volumen de muestra
- Aplicarlos a prácticas de campo, como por ejemplo analizar metales pesados en el agua de un lago y hacer el análisis en el lugar de toma de muestra.
- Analizar otros compuestos con estos aparatitos y hacer una colección de metodologías de análisis.
- Prescindir del espectrofotómetro convencional para trazar los espectros de absorción. La idea es diseñar y construir un microfotocolorímetro con una serie de selectores de longitudes de onda integrados y ordenados en orden ascendente según la longitud de onda que aíslan, de tal manera que se puedan hacer mediciones de absorbancia de un analito a cada longitud de onda y trazar su espectro de absorción.

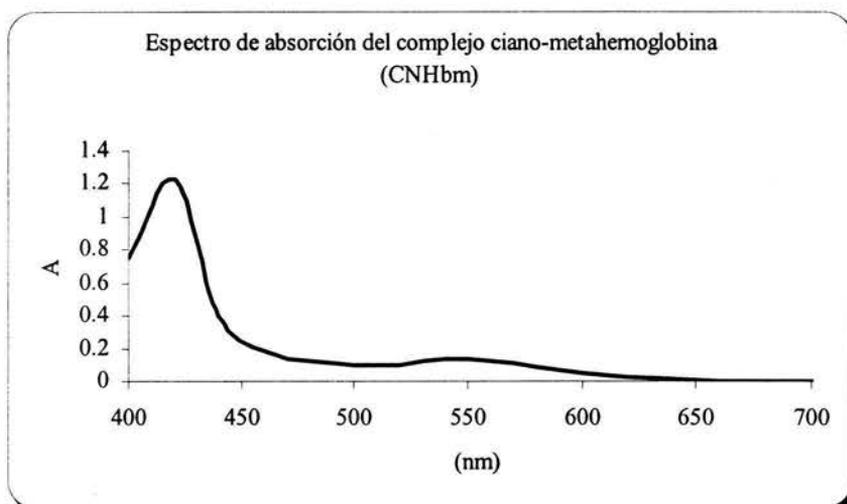


# A P E N D I C E A

## COLECCIÓN DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN

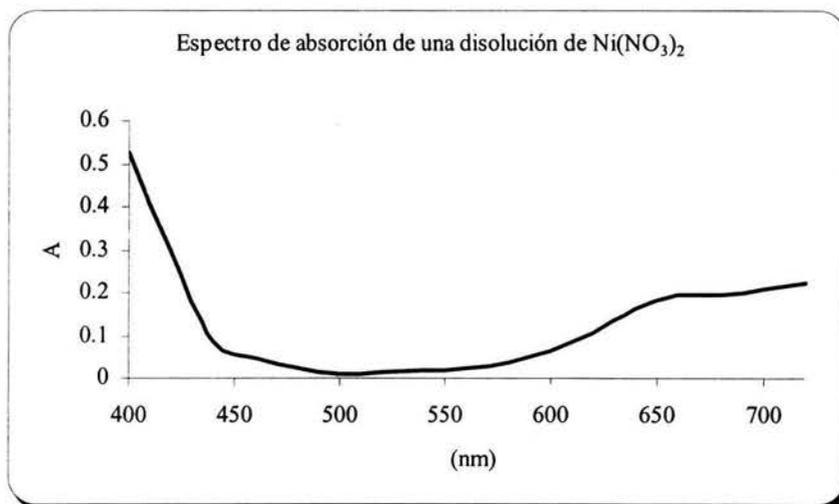
### Espectro de absorción del complejo ciano-metahemoglobina (CNHbm)

$\lambda$ (nm)	A
400	0.756
420	1.233
440	0.4
460	0.183
480	0.12
500	0.093
520	0.102
540	0.131
560	0.116
580	0.09
600	0.052
620	0.023
640	0.01
660	0.006
680	0.003
700	0.003
720	0.003



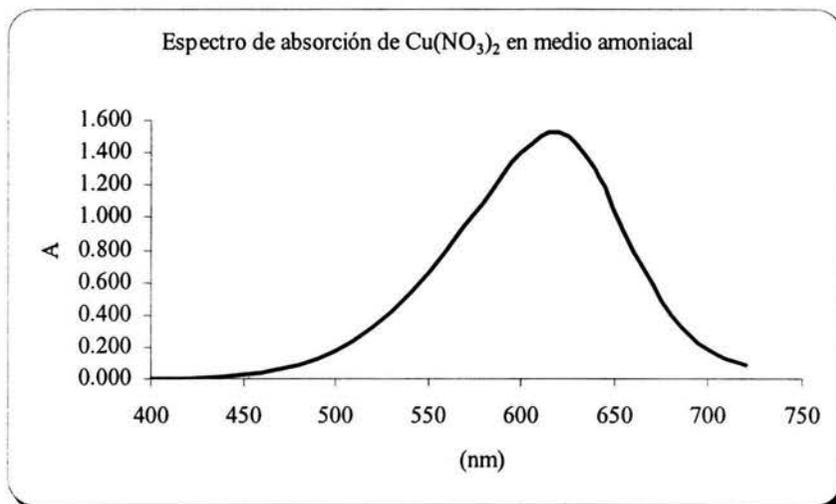
### Espectro de absorción de una disolución $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$

$\lambda$ (nm)	A
400	0.526
420	0.3
440	0.09
460	0.047
480	0.023
500	0.011
520	0.012
540	0.017
560	0.023
580	0.037
600	0.065
620	0.109
640	0.161
660	0.196
680	0.195
700	0.209
720	0.224



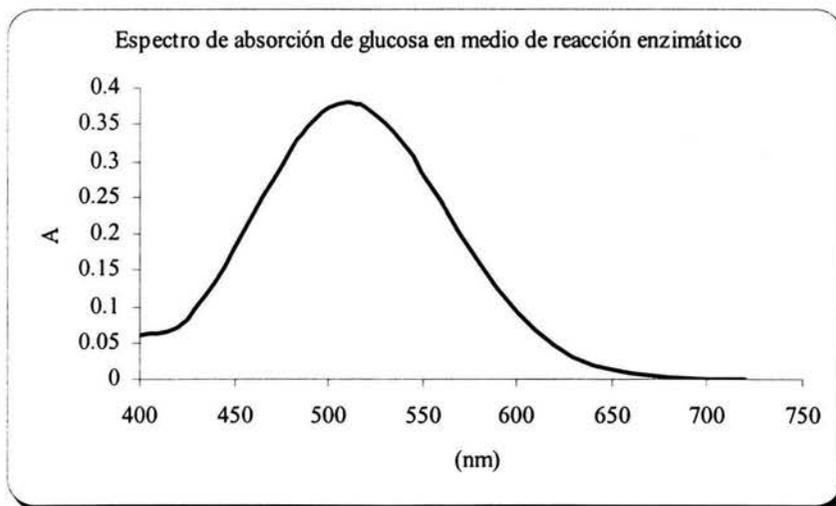
**Espectro de absorción de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en medio amoniacal concentrado.**

$\lambda$ (nm)	A
400	0.000
420	0.000
440	0.009
460	0.041
480	0.086
500	0.174
520	0.319
540	0.538
560	0.796
580	1.097
600	1.398
620	1.523
640	1.301
660	0.796
680	0.398
700	0.187
720	0.081



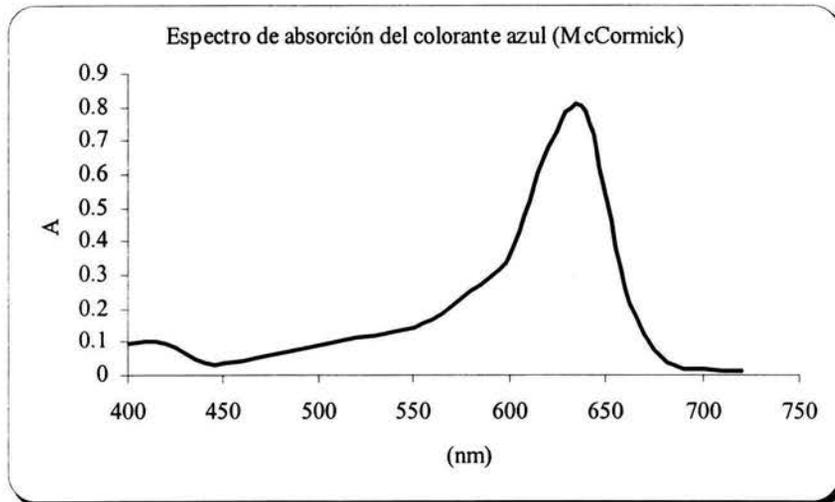
### Espectro de absorción de glucosa en medio enzimático

$\lambda$ (nm)	A
400	0.06
420	0.072
440	0.135
460	0.227
480	0.316
490	0.352
495	0.363
500	0.373
505	0.378
510	0.38
515	0.379
520	0.373
540	0.322
560	0.243
580	0.161
600	0.092
620	0.046
640	0.02
660	0.008
680	0.002
700	0
720	0



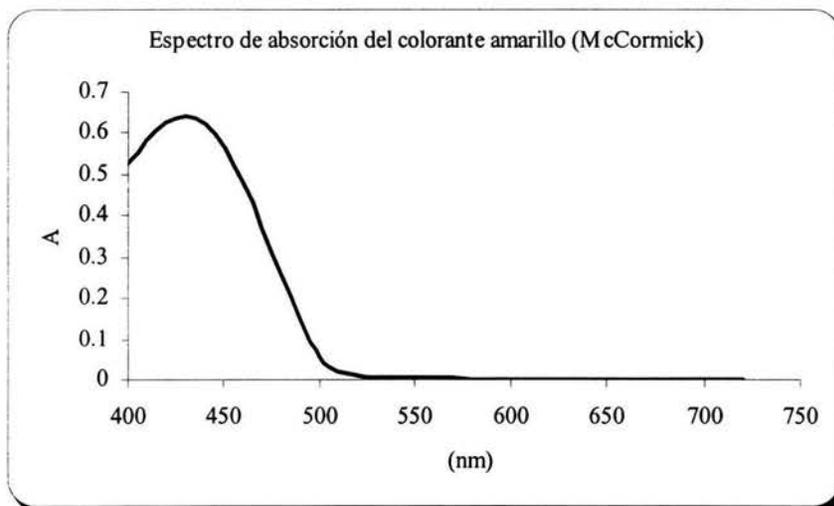
### Espectro de absorción del colorante azul Mc Cormick

$\lambda$ (nm)	A
400	0.096
420	0.095
440	0.039
460	0.044
480	0.066
500	0.09
520	0.114
540	0.131
560	0.171
580	0.253
600	0.359
620	0.681
640	0.785
660	0.256
680	0.05
700	0.016
720	0.01



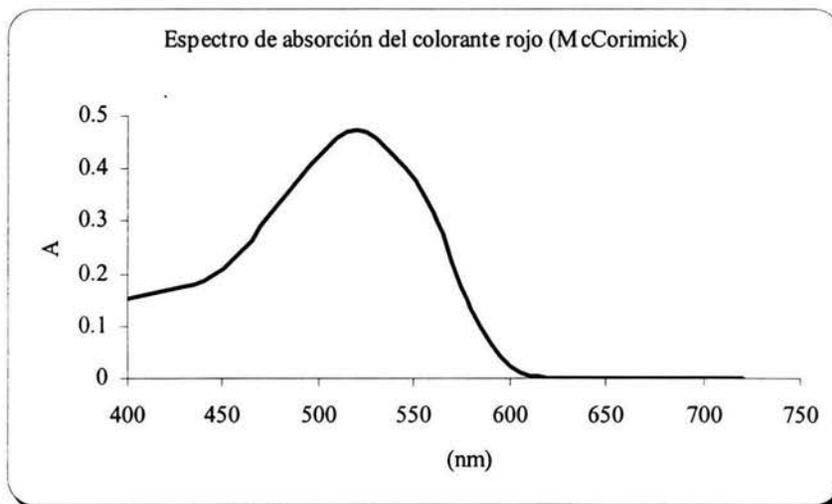
### Espectro de absorción del colorante amarillo Mc Cormick

$\lambda$ (nm)	A
400	0.527
420	0.626
440	0.624
460	0.478
480	0.26
500	0.053
520	0.01
540	0.005
560	0.003
580	0
600	0
620	0
640	0
660	0
680	0
700	0
720	0



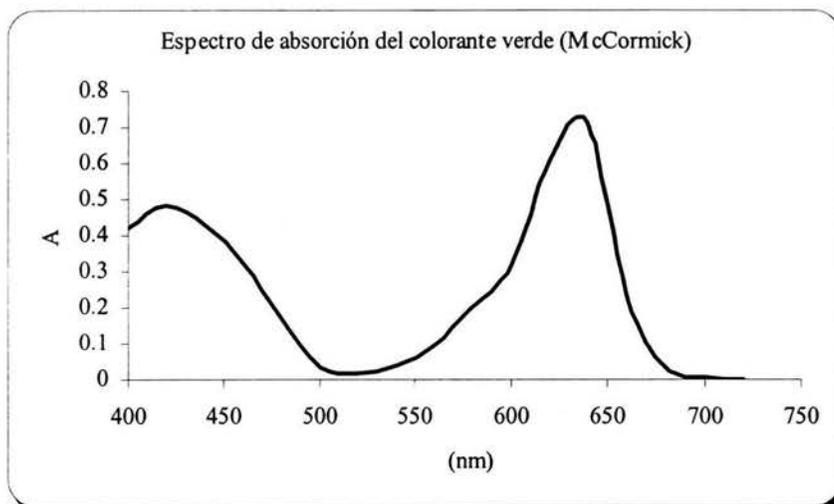
### Espectro de absorción del colorante rojo Mc Cormick

$\lambda$ (nm)	A
400	0.153
420	0.168
440	0.188
460	0.245
480	0.335
500	0.423
520	0.474
540	0.419
560	0.318
580	0.135
600	0.022
620	0
640	0
660	0
680	0
700	0
720	0



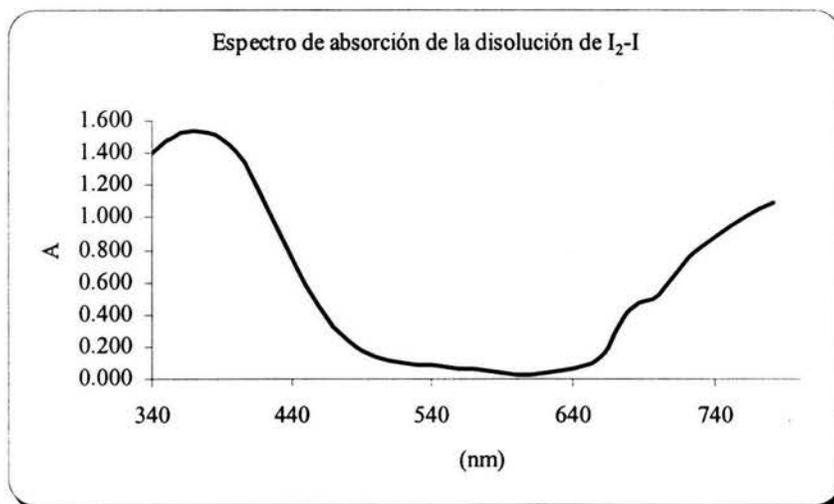
### Espectro de absorción del colorante verde Mc Cormick

$\lambda$ (nm)	A
400	0.423
420	0.483
440	0.426
460	0.32
480	0.175
500	0.036
520	0.017
540	0.041
560	0.094
580	0.198
600	0.314
620	0.606
640	0.709
660	0.229
680	0.035
700	0.003
720	0



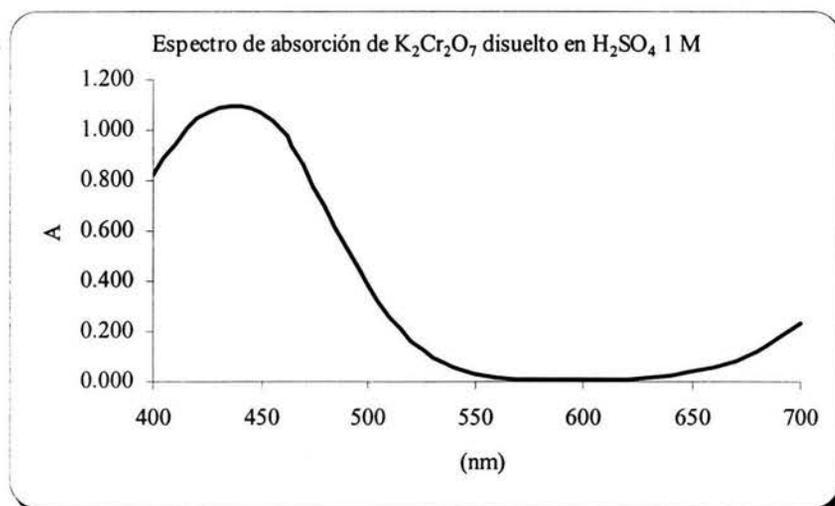
**Espectro de absorción de una disolución de yodo yodurado (I<sub>2</sub>-I)**

$\lambda$ (nm)	A
340	1.398
360	1.523
380	1.523
400	1.398
420	1.097
440	0.745
460	0.444
480	0.237
500	0.137
520	0.097
540	0.081
560	0.066
580	0.051
600	0.027
620	0.036
640	0.066
660	0.131
680	0.432
700	0.523
720	0.745
740	0.886
760	1.000
780	1.097



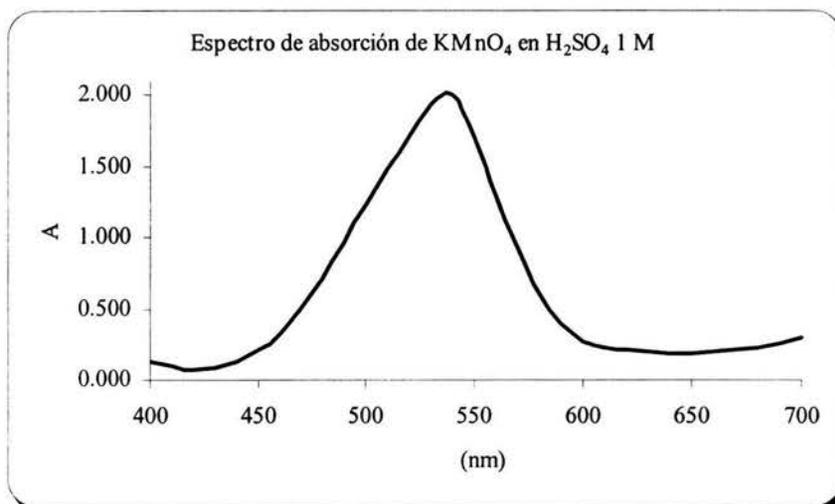
### Espectro de absorción de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) disuelto en $H_2SO_4$ 1 M.

$\lambda$ (nm)	A
400	0.824
420	1.046
440	1.097
460	1.000
480	0.699
500	0.387
520	0.161
540	0.056
560	0.013
580	0.009
600	0.004
620	0.009
640	0.022
660	0.056
680	0.119
700	0.229



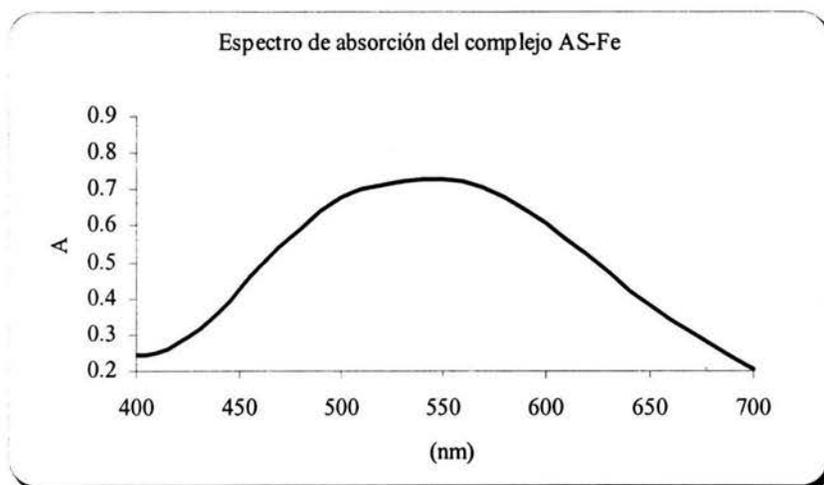
**Espectro de absorción de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) disuelto en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M.**

$\lambda$ (nm)	A
400	0.125
420	0.071
440	0.131
460	0.319
480	0.699
500	1.222
520	1.699
540	2.000
560	1.301
580	0.602
600	0.268
620	0.208
640	0.187
660	0.194
680	0.222
700	0.301



### Espectro de absorción del complejo AS-Fe

$\lambda$ (nm)	A
380	0.31
400	0.244
420	0.276
440	0.365
460	0.484
480	0.594
500	0.677
520	0.71
540	0.727
560	0.723
580	0.678
600	0.606
620	0.521
640	0.42
660	0.343
680	0.273
700	0.203
720	0.154

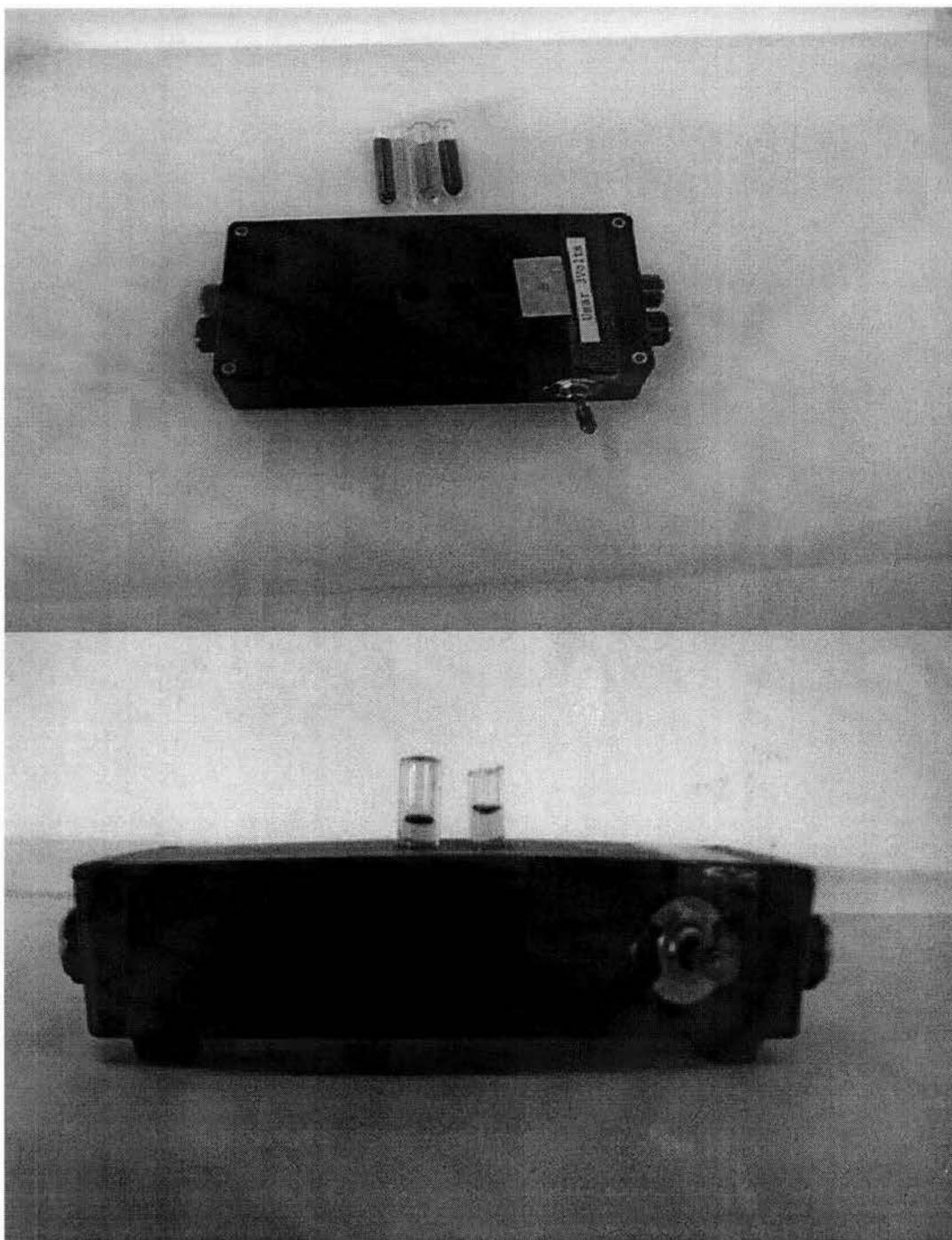




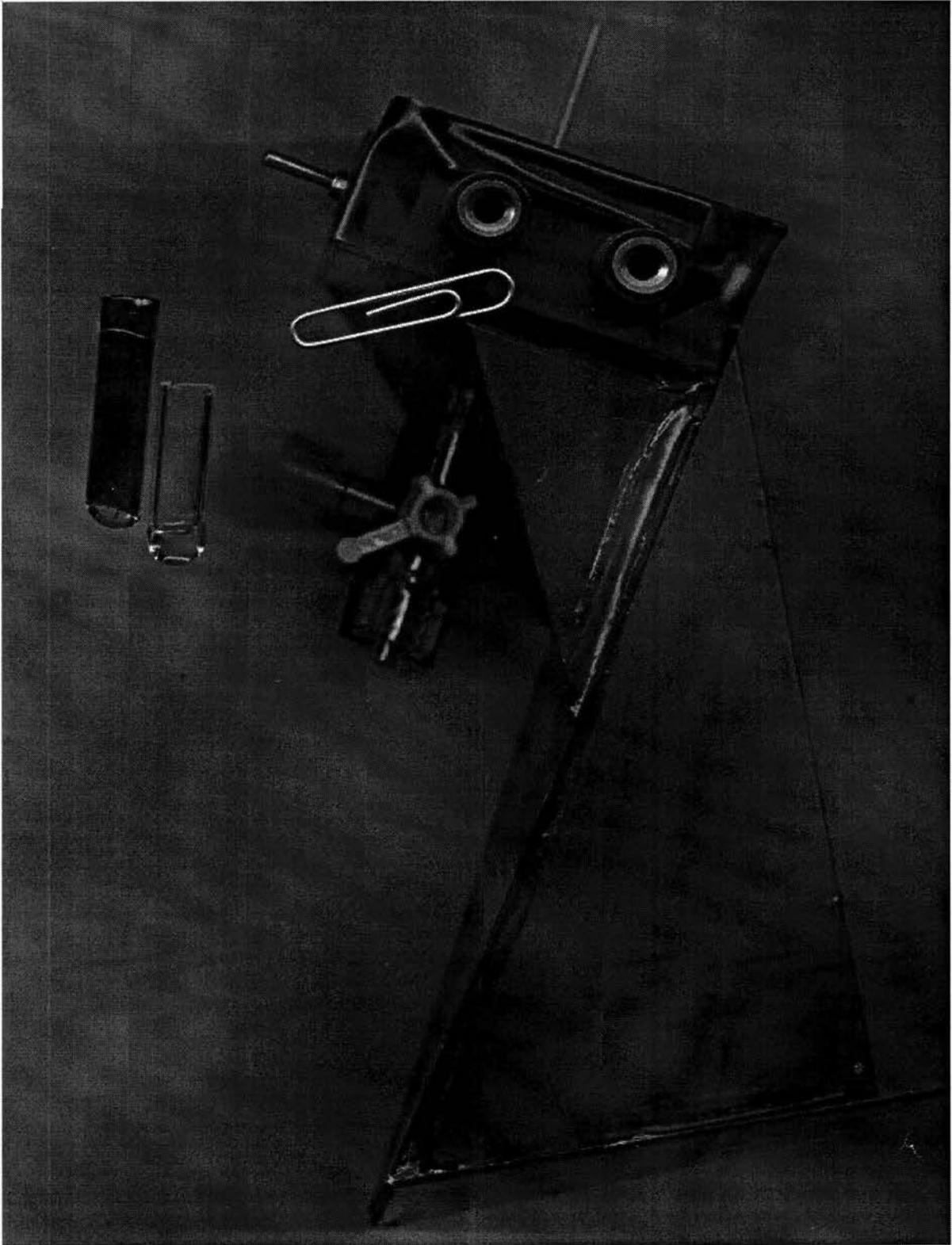
# APENDICE B FOTOS

---

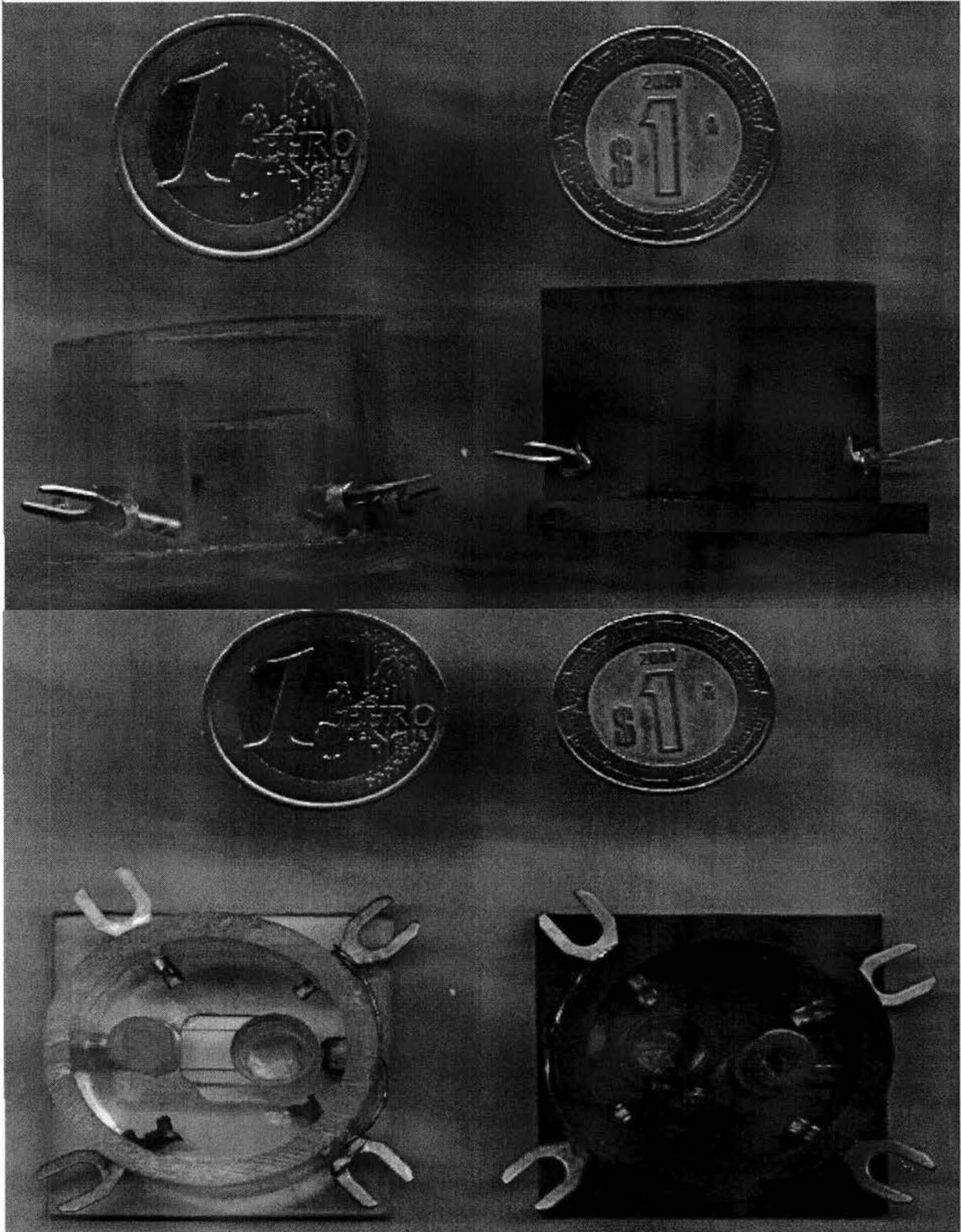
## 1er prototipo de MIMC



## 2do prototipo de MIMC



### 3er prototipo de MIMC





A P E N D I C E C  
A R T Í C U L O

---

## QUÍMICA MICROANALÍTICA: DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO CON MICROFOTOCOLORÍMETROS DE MÍNIMA INSTRUMENTACIÓN (MIMC) DE BAJO COSTO

J. M. Martínez y A. Baeza

Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México, México, Tel. 56223750, [juanma@litio.pquim.unam.mx](mailto:juanma@litio.pquim.unam.mx),  
[baeza@servidor.unam.mx](mailto:baeza@servidor.unam.mx)

### 1. Introducción:

Por más de cuarenta años los métodos ópticos de análisis han desarrollado un gran auge en la disciplina de la Química Analítica. Actualmente las normas ecológicas y los estudios de impacto ambiental están fuertemente orientados a la disminución de residuos, y la Química Analítica se presenta ante el reto de realizar sus actividades a nivel microescala. Por otra parte, el área de enseñanza experimental es un buen ejemplo para inducir al educando y crear conciencia del asunto. Cabe mencionar que además del beneficio ecológico obtenido con la microescala, adicionalmente se obtiene un beneficio económico, por la reducción de costos que implica el uso de cantidades pequeñas de reactivo, y la fabricación de los instrumentos en el propio laboratorio.

En Química General y Química Sintética orgánica e inorgánica se han desarrollado numerosas técnicas y metodologías a microescala total pero no así en Química Analítica. El incipiente desarrollo en éste ámbito en Química analítica es la falta de equipo de medición a microescala de aceptable precisión y sobre todo de bajo costo.

En este trabajo se proponen tres prototipos de Microfotocolorímetros de Mínima Instrumentación contruidos con materiales de bajo costo y de alta precisión para la cuantificación de Ácido Acetilsalicílico en tabletas de Aspirina®; además se presentan las gráficas de Ringbom para la determinación del intervalo de concentraciones de trabajo, las curvas ponderadas para demostrar la precisión y reproducibilidad de los datos

obtenidos y los datos estadísticos para la comparación de los resultados obtenidos entre los tres prototipos de MIMC's y los obtenidos con un espectrofotómetro convencional.

## **2. Objetivos**

Diseñar, construir y caracterizar tres prototipos de microfotocolorímetros de mínima instrumentación (MIMC) para la cuantificación de analitos (AAS en tabletas de aspirina) por medio de curvas de calibración con soluciones estándar. Además realizar las pruebas estadísticas para demostrar que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los MIMC's y un espectrofotómetro comercial.

## **3. Materiales, Reactivos, Equipos y Métodos**

### *3.1 Materiales y equipos.*

Acrílico comercial, microceldas fotorresistivas, focos de gota de 6 V, cable de bajo calibre, campanas de Durham, tubos capilares de vidrio, microceldas de ensayos enzimáticos, llaves de tres vías, eliminador de voltaje (1.5 V – 12 V), multímetro de bajo costo, ácido salicílico estándar (AS), Cloruro de Hierro III hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), ácido clorhídrico 0.5 M, hidróxido de sodio 0.5 M, tabletas de ácido acetilsalicílico 500 mg (Aspirina), solución de yodo-yodurado ( $\text{I}_2\text{-I}$ ) 0.045 M, Espectrofotómetro (Espectronic 20).

### *3.2 Diseño y Construcción de los tres prototipos de MIMC.*

En los tres modelos las cajas se construyen con acrílico pintado de negro unido con pegamento líquido. Posteriormente se ensambla el foco y la fotorresistencia. En el primer modelo tanto para la microcelda del monocromador como para la de la muestra se usan campanas de Durham; en el segundo modelo la campana de Durham para la muestra se sustituye por un tubo capilar de vidrio en cuya salida se encuentra una llave de tres vías (utilizada en las prácticas médicas de venoclisis) que facilita el desagüe de las muestras y la inyección de la siguiente solución; y en el tercer modelo esta se cambia por una microcelda para ensayos enzimáticos. El foco se conecta a la fuente de luz y la fotorresistencia se conecta al multímetro.

A continuación se muestran los esquemas de los tres prototipos de MIMC:

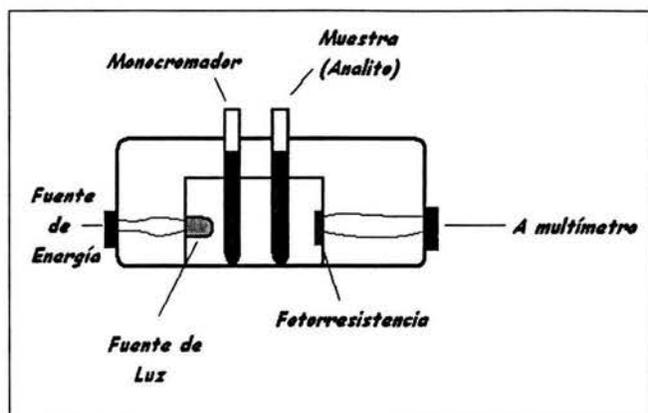


Fig. 1: 1er prototipo de MIMC

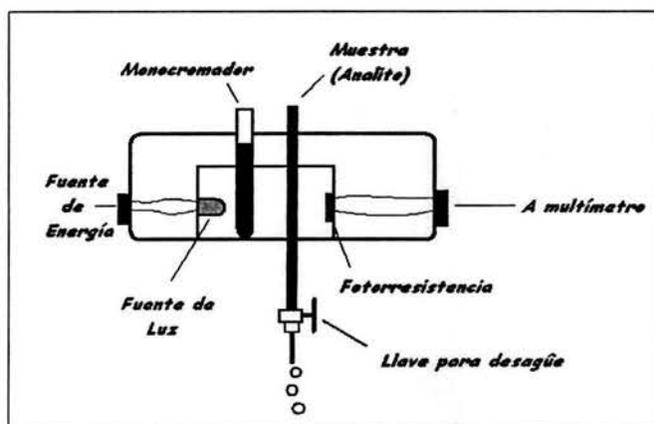


Fig. 2: 2do Prototipo de MIMC

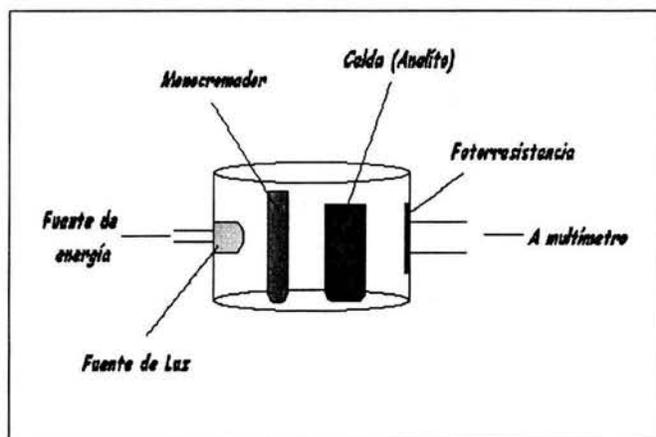


Fig. 3: 3er prototipo de MIMC

### *3.3 Determinación del intervalo de concentraciones de trabajo (Linearidad) por medio de las gráficas de Ringbom.*

En un vaso de precipitados de 50 mL pesar aproximadamente con exactitud 44.0 mg de AS, adicionar 10 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, adicionar 10 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar al aforo con agua destilada. Tomar alícuotas de 0.07, 0.14, 0.28, 0.58, 0.88, 1.2, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 mL y transferir cada una a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar a l aforo con agua destilada.

Por otro lado en vasos de precipitados de 10 mL pesar por separado aproximadamente con exactitud 8.8, 12.4, 16.6, 19.8, y 23.9 mg de AS, adicionar 4 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, adicionar 4 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada.

Medir la resistencia residual (respuesta a la poca luz que se filtra, es decir; con la luz apagada). Conectar a la fuente de energía y dejar el foco prendido durante 15 minutos, posteriormente medir la resistencia de las soluciones estándar incluyendo un blanco (disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M) en el MIMC utilizado.

### *3.4 Preparación de las soluciones estándar de AS.*

a) Para curva de calibración del espectrofotómetro.

En un vaso de precipitados de 25 mL pesar aproximadamente con exactitud 21.3 mg de AS, adicionar 5 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, adicionar 5 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Tomar alícuotas de 142, 284, 587, 880 y 1174  $\mu\text{L}$  y transferir cada una a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada. Medir la Absorbancia de las soluciones en el espectrofotómetro utilizando como blanco una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M y una longitud de onda de 520 nm.

b) Para curva de calibración de los MIMC's

En un vaso de precipitados de 25 mL pesar aproximadamente con exactitud 42.6 mg de AS, adicionar 10 mL de NaOH 0.5 M y disolver completamente con calentamiento. Dejar enfriar, agregar 10 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Tomar alícuotas de 4, 5, 6, 7 y 8 mL y transferir cada una a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada.

Medir la resistencia residual (respuesta a la poca luz que se filtra, es decir; con la luz apagada). Conectar a la fuente de energía y dejar el foco prendido durante 15 minutos, posteriormente medir la resistencia de las soluciones estándar incluyendo un blanco (disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M) en el MIMC utilizado.

### *3.5 Preparación de la muestra*

Determinar el peso promedio de no menos de 10 tabletas. Triturar y micronizar las tabletas en un mortero (mezcla compuesta).

a) Muestra para determinar contenido de AAS utilizando el espectrofotómetro.

En un vaso de precipitados de 25 mL pesar el equivalente a 27.8 mg de AAS de la mezcla compuesta, adicionar 5 mL de NaOH 0.5 M y disolver con calentamiento durante 10 minutos teniendo cuidado de que no se pierda mucho volumen de disolvente durante la evaporación. Dejar enfriar, agregar 5 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Filtrar la disolución anterior por una torunda de algodón. De la solución filtrada tomar una alícuota de 587  $\mu\text{L}$  y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada. Medir la Absorbancia de la solución en el espectrofotómetro utilizando como blanco una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M y una longitud de onda de 520 nm.

b) Muestra para determinar contenido de AAS utilizando los MIMC's.

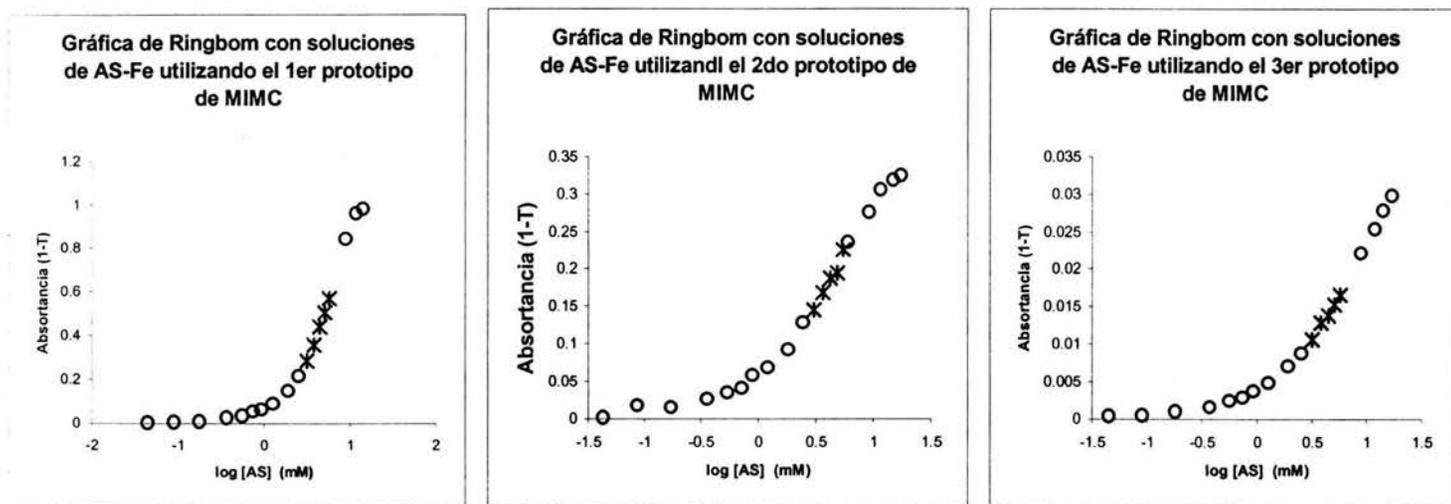
En un vaso de precipitados de 25 mL pesar el equivalente a 27.8 mg de AAS de la mezcla compuesta, adicionar 5 mL de NaOH 0.5 M y disolver con calentamiento durante 10 minutos teniendo cuidado de que no se pierda mucho volumen de disolvente durante la evaporación. Dejar enfriar, agregar 5 mL de HCl 0.5 M, trasvasar cuantitativamente a un

matraz volumétrico de 25 mL y llevar al aforo con agua destilada. Filtrar la disolución anterior por una torunda de algodón. De la solución filtrada tomar una alícuota de 6 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 M y llevar al aforo con agua destilada. Medir la resistencia residual (respuesta a la poca luz que se filtra, es decir; con la luz apagada). Conectar a la fuente de energía y dejar el foco prendido durante 15 minutos, posteriormente medir la resistencia de las muestras incluyendo un blanco (disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015 M) en el MIMC utilizado.

#### **4. Resultados**

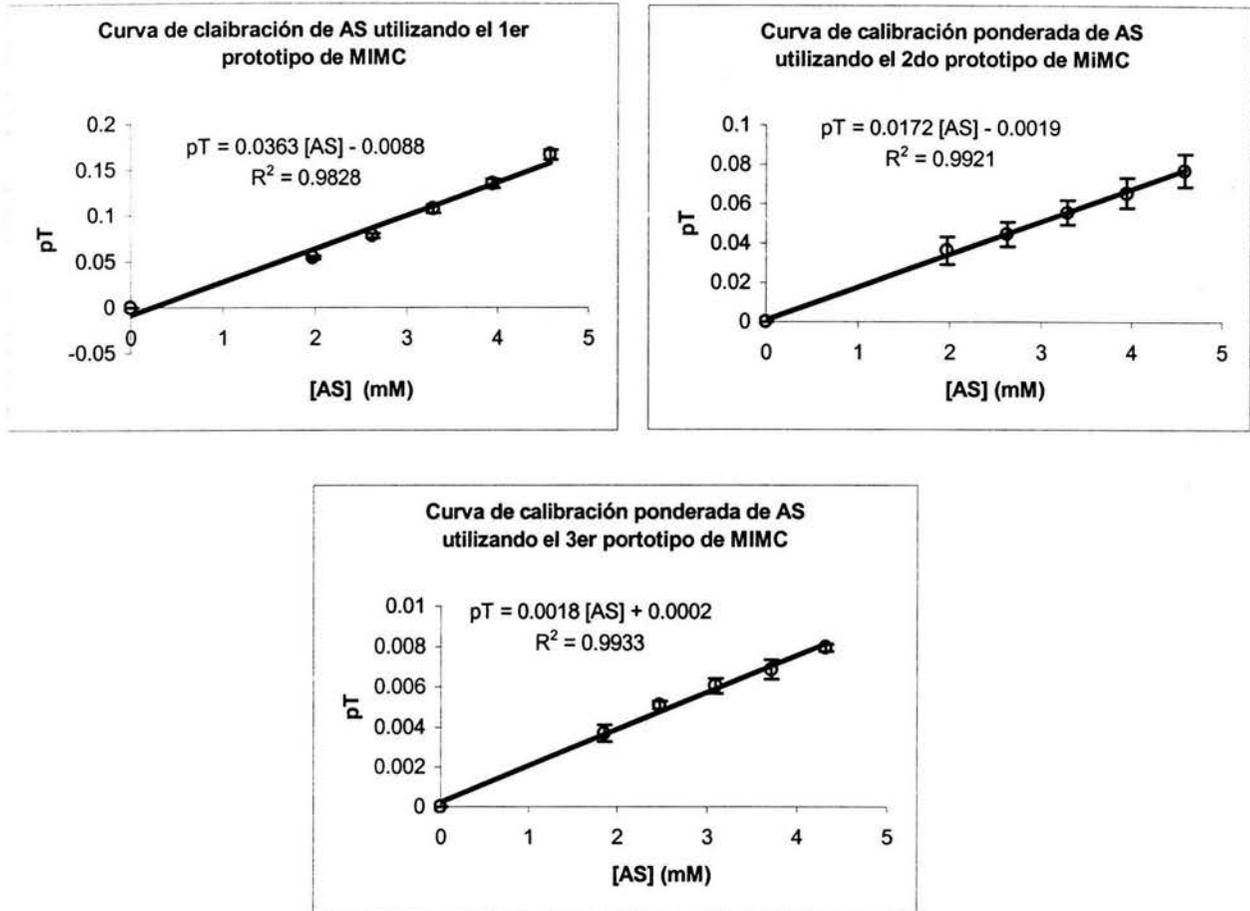
Para la elección de la solución monocromadora se trazó primero el espectro de absorción del complejo AAS-Fe. En base a este y al color del complejo (violeta) se eligió una solución de yodo-yodurado 0.045 M como monocromador. Los espectros de absorción obtenidos mostraron que la solución de yodo yodurado aísla la longitud de onda a la cual el complejo AAS-Fe tiene su máximo de absorción (520 nm).

Utilizando las gráficas de Ringbom se determinó que el intervalo de concentraciones de trabajo en el cual la respuesta del detector se comporta linealmente va de 2 mM a 6 mM (Fig. 4). Es bajo este intervalo de trabajo que se trazarán las curvas de calibración y se determinará el contenido de AAS en las tabletas de aspirina<sup>®</sup>. Estas condiciones son válidas para los tres microfotocolorímetros.



**Fig. 4. Gráficos de Ringbom para la determinación del intervalo de concentraciones de trabajo. Los puntos marcados con x corresponden a los puntos elegidos como intervalo de trabajo.**

Una vez determinadas las concentraciones de AS de trabajo se procedió a realizar las curvas de calibración ponderadas para demostrar la precisión de la respuesta del detector a las diferentes concentraciones de las disoluciones estándar, obteniéndose coeficientes de correlación lineal de 0.98 y 0.99, y coeficientes de variación de 3-7 % para réplicas (n = 10) de 5 estándares (Fig. 5).



**Fig. 5. Curvas de calibración ponderadas con disoluciones de AS estándar en concentraciones de 2 a 5 mM. Se muestran las barras de error de las 5 disoluciones estándar que indican la dispersión de la absorbancia obtenida en cada réplica.**

Para demostrar que con los MIMC's se obtienen curvas de calibración comparables con las obtenidas con un espectrofotómetro comercial, se trazó en este último una curva de calibración con disoluciones estándar de AS de concentraciones entre 0.1 mM y 0.9 mM. El coeficiente de correlación lineal obtenido ( $r^2 = 0.9996$ ) es comparable con los obtenidos con los MIMC's (Fig. 6).

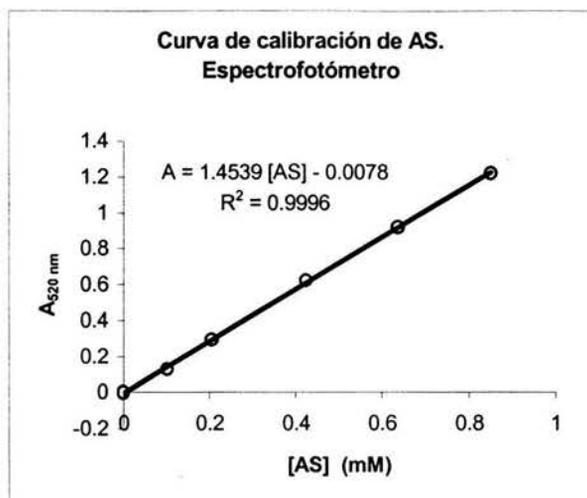


Fig. 6. Curva de calibración con soluciones de AS (0.1 mM – 0.9 mM) en un Espectrofotómetro (Espectronic 20).

Por último se realizó la cuantificación de AAS en tabletas de Aspirina<sup>®</sup> utilizando el espectrofotómetro y los tres prototipos de MIMC's. Para ello se trazó la curva de calibración correspondiente y se midió la respuesta de las muestras de AAS, haciendo 5 réplicas por cada método.

### Resultados de las Muestras

Los resultados de la cuantificación de AAS en las tabletas de Aspirina por el método espectrofotométrico y el método microfotocolorimétrico se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 1. Respuestas de las muestras (kΩ) obtenidas en cada uno de los prototipos de MIMC.

No. de muestra	Peso de muestra (g)	1er prototipo de MIMC	2do prototipo de MIMC	3er prototipo de MIMC
Rr		99.6	98.2	309
Ro		6.5	41	4.3
1	0.0342	18.6	48.2	10.6
2	0.0336	18.5	47.7	10.4
3	0.0331	18.3	47.8	10.1
4	0.0328	18.3	47.9	10.9
5	0.0321	18.1	48.2	11

Las respuestas de las muestras ( $k\Omega$ ) fueron transformadas a absorbancia ( $pT$ ) con la ecuación

$$pT = -\text{Log} \frac{(Ri - Rr)}{(Ro - Rr)}$$

Donde:

$pT$ : Absorbancia.

$Ri$ : Respuesta de la  $i$ ésima especie, en este caso las respuestas de las muestras y el blanco.

$Rr$ : Respuesta residual, es decir, la respuesta a la poca luz que se filtra la cual se mide con la luz apagada.

$Ro$ : La respuesta del blanco.

Posteriormente, utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida en la curva de calibración en cada uno de los MIMC's, se determinó la concentración de cada una de las muestras con la cual se determinó porcentaje de AAS con respecto al marbete presente en las tabletas de Aspirina. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\%AAS = \frac{C}{1000} * \frac{138.125}{1000} * \frac{10}{6} * \frac{25}{138.125} * \frac{180.16}{pm} * \frac{pp}{pe} * 100$$

Donde:

$C$ : es la concentración de AAS de la muestra determinada con la curva de calibración correspondiente.

$pm$ : Es el peso de la muestra.

$pp$ : es el peso promedio de las tabletas.

$pe$ : es el contenido de AAS especificado en el marbete (0.5 g de AAS por tableta)

A continuación se muestra la tabla con los resultados obtenidos.

**Tabla 2: Porcentaje de AAS cuantificado en las tabletas de aspirina. Estos resultados están referidos a la cantidad especificada en el marbete.**

No. de muestra	1er prototipo de MIMC	2do prototipo de MIMC	3er prototipo de MIMC
1	104.65	115.11	103.06
2	105.64	108.07	103.74
3	105.26	111.54	100.21
4	104.32	114.42	100.24
5	103.67	122.64	101.00
Media	104.71	114.36	101.65
S <sup>2</sup>	0.7754	5.4027	1.6444
CV %	0.7405	4.7245	1.6177
S	0.6012	29.1892	2.7040

De igual manera, se midió la absorbancia (pT) de cada una de las muestras utilizando el espectrofotómetro y posteriormente se calculó el porcentaje de AAS con respecto al marbete presente en las tabletas de Aspirina. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\%AAS = \frac{C}{1000} * \frac{138.125}{1000} * \frac{10}{0.587} * \frac{25}{138.125} * \frac{180.16}{pm} * \frac{pp}{pe} * 100$$

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 3. Absorbancia y % de AAS determinado en cada una de las muestras por el método Espectrofotométrico.**

No. de muestra	Peso de muestra (g)	T (%)	pT	% de AAS cuantificado respecto al marbete
1	0.0371	18	0.7447	97.82
2	0.0326	22	0.6576	98.03
3	0.0329	22	0.6576	97.13
4	0.0327	22	0.6576	97.73
5	0.0305	25	0.6021	95.72
			Media	97.29
			S <sup>2</sup>	0.9360
			CV %	0.9621
			S	0.8761

Para comparar los resultados obtenidos con el espectrofotómetro y los obtenidos con los microfotocolorímetros se recurrió a una prueba de F, en la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 4. Resultados de la prueba de F.

Método	Varianza (S)	$F_{exp}$	$F_{0.05}$	¿Diferencia Significa?
MIMC 1	0.6012	0.6862	6.39	NO
MIMC 2	29.1892	33.3186	6.39	SI
MIMC 3	2.7040	3.0866	6.39	NO
Espectrofotómetro	0.8761			

## **5. Discusión**

En el presente trabajo se demostró que con materiales de bajo costo y de fácil acceso se pueden construir instrumentos para análisis óptico en el propio laboratorio con los que se obtienen curvas de calibración típicas con excelentes coeficientes de correlación lineal.

En las curvas de calibración ponderadas se puede observar que se obtiene una buenísima precisión y reproducibilidad de la respuesta obtenida en cada una de las concentraciones de las disoluciones ensayadas, lo que asegura una adecuada respuesta de la muestra y en consecuencia la cuantificación del contenido de fármaco en las tabletas.

Por otro lado, el porcentaje de AAS recuperado en cada uno de los métodos, según los resultados obtenidos por la prueba de hipótesis nula o de F, el 1er y 3er prototipo de MIMC no muestra una diferencia significativa al compararlo con los resultados obtenidos con el espectrofotómetro, pero el 2do prototipo de MIMC difiere mucho en resultados con el método convencional.

De los tres prototipos de MIMC el único que presenta problemas en cuanto a la precisión es el 2do modelo, el problema radica en el diámetro del capilar utilizado como microcelda para la muestra (el cual es muy pequeño) y la inestabilidad de la emisión de la luz del

foco; la solución entonces es aumentar el diámetro del capilar y controlar el voltaje con un regulador. Sin embargo este modelo presenta algunas ventajas técnicas sobre los demás ya que posee una llave de desagüe que facilita la eliminación de la muestra, la inyección de la muestra siguiente y el lavado de la microcelda entre cada solución inyectada.

El MIMC-III presenta la ventaja de que el detector (foto-resistencia) no se satura en presencia de disoluciones de elevada concentración.

Los tres microfotocolorímetros utilizan volúmenes muy pequeños, de apenas 200  $\mu\text{L}$ .

## **6. Conclusiones**

- Se construyeron equipos para el análisis óptico con materiales de fácil acceso y bajo precio con los que se obtuvieron resultados con linealidad, precisión, exactitud y reproducibilidad aceptables y comparables con los obtenidos con un espectrofotómetro comercial.
- El % de recuperación de AAS con respecto al marbete obtenido espectrofotométricamente y microfotocolorimétricamente no muestra diferencia significativa.
- La aplicación de los microfotocolorímetros es múltiple, especialmente dentro de las prácticas de campo, ya que debido a su tamaño pueden llevarse a cualquier parte en donde se requiera hacer un análisis, además ofrecen una gran ventaja cuando las muestras son susceptibles a cambios y degradación durante el traslado de la misma desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, porque el análisis se puede hacer en el mismo sitio.
- El volumen utilizado de disolución estándar o muestra (apenas de 200  $\mu\text{L}$ ) es muy pequeño comparado con los 3 o 5 mL utilizados en los espectrofotómetros. Esto implica entonces una disminución significativa de los reactivos utilizados, una reducción de los costos en cada análisis y una reducción de residuos y contaminantes.
- Es además, desde el punto de vista docente, una alternativa para las prácticas de laboratorio de análisis porque permite conocer al educando el fundamento de los

métodos ópticos de análisis, ya que el alumno puede construir su propio equipo. Por otro lado se crea una conciencia ecológica y de ahorro en los alumnos.

### **7. Bibliografía.**

- A. Baeza. Microbureta a Microescala Total para Titulometría. *Revista Chilena de Educación Científica*. **1-2(2003)4-7**.
- A. Baeza. Titulaciones Ácido-base Potenciométricas a Microescala Total con Microsensores de pH y de Referencia de Bajo Costo. *Revista Chilena de Educación Científica*. **1-2(2003)16-19**.
- A. Baeza. Análisis Instrumental a microescala para la Docencia. Memorias de la II Conferencia Internacional de Química. UCLV, Cuba. 2003.