



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

QUÍMICA ANALÍTICA A MICROESCALA TOTAL EN MICROCELDAS SERIALES:  
 $\mu$ FOTOCOLORIMETRÍA,  $\mu$ VOLTAMPEROMETRÍA Y  $\mu$ POTENCIOMETRÍA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO

PRESENTA:

HUGO MARTINEZ RIVAS

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Alejandro Baeza Reyes



Ciudad de México      2020



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:** Profesor: José Alejandro Baeza Reyes

**VOCAL:** Profesor: Patricia Diaz Arista

**SECRETARIO:** Profesor: Arturo de Jesus Garcia Mendoza

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Brenda Lizette Ruiz Herrera

**2° SUPLENTE:** Profesor: Gustavo Adolfo Zelada Guillen

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA, INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA EXPERIMENTAL.  
ANEXO 3E, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. José Alejandro Baeza Reyes

**SUSTENTANTE (S):**

---

Hugo Martinez Rivas

## Contenido

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS. _____	1
Capítulo I/ Introducción. _____	4
- <b>1.1 Química Analítica a Microescala Total. Principios.</b> _____	5
- <b>1.2. Objetivo general</b> _____	10
- <b>1.3. Hipótesis General</b> _____	10
Capítulo II/ Antecedentes. QAMT. Principios teóricos. _____	11
- <b>2.1. Ley de Lambert-Beer- Bouger</b> _____	11
• 2.1.1. Limitaciones reales de la ley de Beer. _____	13
• 2.1.2. Desviaciones químicas aparentes. _____	14
- <b>2.2. MIMC.</b> _____	15
• 2.2.1. Fuente de luz. _____	17
• 2.2.2. Monocromador. _____	19
• 2.2.3. Celda. _____	21
• 2.2.4. Detector. _____	23
• 2.2.5. Diseño del MIMC. _____	25
- <b>2.3. Micro electroquímica. Voltamperometría.</b> _____	26
- <b>2.4. MIMP.</b> _____	32
• 2.4.1. Características del sistema de análisis: MIMP y Potenciostato _	32
- <b>2.5. MIMISE.</b> _____	36
• 2.5.1. Equipo para la detección de iones $H^+$ _____	40
• 2.5.2. Equipo para la detección de iones $Cl^-$ . _____	42
Capítulo III/ Parte experimental. _____	44
- <b>3.1. Curvas de calibración microfotolorimétricas.</b> _____	44
• 3.1.1. Objetivo particular. _____	44
• 3.1.2. Hipótesis particular. _____	44
• 3.1.3. Materiales y métodos. _____	45
• 3.1.4. Preparación de disoluciones _____	47
○ 3.1.4.1. Ensayos de la disolución colorida cobre-amoniaco. _____	47
○ 3.1.4.2. Ensayos de la disolución colorida del reactivo de Biuret. ____	48

○	3.1.4.3. Ensayos de la disolución colorida del reactivo de Drabkin.	49
○	3.1.4.4. Ensayos de la disolución colorida de la reacción Karl Fischer.	51
○	3.1.4.5. Ensayos con la reacción de luminol con Hb.	53
•	3.1.5. Resultados de los ensayos microfotocolorimétricos.	56
○	3.1.5.1. Resultados de los ensayos usando el complejo cobre amoniaco.	56
○	3.1.5.2. Resultados de los ensayos usando el reactivo de Biuret.	63
○	3.1.5.3. Resultados de los ensayos usando el reactivo de Drabkin.	67
○	3.1.5.4. Resultados de los ensayos usando el reactivo de Karl-Fischer.	73
○	3.1.5.5. Resultados de los ensayos usando Luminol.	78
•	3.1.6. Conclusiones parciales.	80
-	<b>3.2. Curvas de calibración voltamperométricas.</b>	82
•	3.2.1. Objetivos particulares	82
▪	3.2.2. Hipótesis particular	82
•	3.2.3. Materiales y métodos	83
•	3.2.4. Comprobación de funcionamiento de los equipos MIMP y potencióstato	84
•	3.2.5. Resultados utilizando MIMP.	88
○	3.2.5.1. Análisis para el medio de reacción.	88
○	3.2.5.2. Análisis de 20 $\mu\text{L}$ de $\text{I}_2/\text{KI}$ 0.1 F en 100 $\mu\text{L}$ de $\text{KNO}_3$ .	90
○	3.2.5.3. Análisis de 20 $\mu\text{L}$ de $\text{I}_2/\text{KI}$ 0.1 F en 100 $\mu\text{L}$ de $\text{KNO}_3$ por voltamperometría cíclica.	91
•	3.2.6. Resultados usando potencióstato:	95
	3.2.6.1. Análisis de $\text{I}_3$ en $\text{KNO}_3$ a distintas concentraciones	95
○	3.2.6.2. Resultados de voltamperogramas cíclicos para a diferentes velocidades de barrido utilizando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .	98
○	3.2.6.3. Resultados de la relación entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y la altura de pico de corriente.	104
•	3.2.7. Conclusiones particulares	107
-	<b>3.3. Curvas de calibración micropotenciométricas.</b>	109
•	3.3.1. Objetivos particulares.	109
•	3.3.2. Hipótesis particular.	109

• 3.3.3. Materiales y métodos.	110
• 3.3.4. Resultados para la detección de iones $H^+$ .	112
○ 3.3.4.1. Ensayos de la titulación $HCl-NaOH$ .	114
○ 3.3.4.2. Ensayos de la titulación Biftalato de potasio- $NaOH$ .	117
• 3.3.4.3. Ensayos de la titulación $HCl-Na_2CO_3$ .	121
• 3.3.5. Resultados para la determinación de iones $Cl^-$ .	126
○ 3.3.5.1. Sensibilidad ante iones $Cl^-$ .	126
○ 3.3.5.2. Titulación Argentométrica.	129
• 3.3.5. Conclusiones parciales.	132
Capítulo IV/ Discusión y conclusiones.	133
Capítulo V/ Anexo.	134
Capítulo VI/ Bibliografía.	147

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

A: Absorbancia

a: Área del electrodo /  $\text{cm}^2$

APD: Avalanche Photodiode (fotodiodo de avalancha)

$C_0$ : Concentración inicial /  $\text{mol L}^{-1}$

D: Coeficiente de diffusion /  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

$\varepsilon$ : Coeficiente de absortividad molar de la especie  $i$  /  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

EA: Electrodo auxiliar

ER: Electrodo de referencia

ET: Electrodo de trabajo

$E_{pa}$ : potencial de pico anódico

$E_{pc}$ : potencial de pico catódico

$E_{prom}$ : Potencial promedio / V

F: Constante de Faraday

Hb: Hemoglobina humana

$HIn^-$ : Forma protonada del indicador

$In^{2-}$ : Forma no protonada del indicador

$[i]$ : Concentración molar de la  $i$ -ésima especie /  $\text{mol L}^{-1}$

$i$ : intensidad de corriente eléctrica / mA

$i_{pa}$ : Intensidad de corriente de pico anódico

$i_{pc}$ : Intensidad de corriente de pico catódico

$i_p$  = Corriente límite en amperios

$I_0$  = Luz incidente

$I$  = Luz transmitida después de la interacción con una sustancia

ISE: Ion selective electrode (electrodo de iones selectivo)

$L$ : Intensidad luminosa / Lux

L: Litros

LDR: Light Dependent Resistor (resistencia dependiente de la luz)

LED: Light Emitting Diode (diodo emisor de luz)

log: Logaritmo base 10

ln: Logaritmo natural

$l$ : Longitud / cm

$\lambda$ : Longitud de onda / nm

MIMC: Minimal Instrumentation Micro Colorimetric (micro colorímetro de mínima instrumentación)

MIMISE: Minimal Instrumentation Micro Ion Selective Electrode (microelectrodo de ion selectivo de mínima instrumentación)

MIMP: Minimal Instrumentation Micro Polarograph (micro polarógrafo de mínima instrumentación)

m: metro

$\mu$ : micro

$\mu A$ : micromperios

$n$ : Número de electrones transferidos



pKa: Cologaritmo de la constante de acidez del par conjugado ácido-base

$H \ln^{-1} / \ln^{-2}$

PMT: Photomultiplier Tubes (tubos fotomultiplicadores)

PT: Phototransistor (fototransistor)

QAMT: Química analítica a microescala total

R: constante del gas ideal /  $J K^{-1} mol^{-1}$

R: Resistencia / Ohms ( $\Omega$ )

Ra: Intervalo de escan / V

Ro: Respuesta de la disolución blanco

Ri: Respuesta de la disolución del analito

Rr: Respuesta con la luz apagada

s: segundos

T = temperatura / K

Tr: Transmitancia

V: Volt

## Capítulo I/ Introducción.

En la actualidad los equipos e instrumentos necesarios para la experimentación en el campo de química analítica se diseñan de manera altamente especializada para llevar a cabo los análisis requeridos en diferentes líneas de investigación o bien se desarrollan de forma en que pueden ofrecer las técnicas más avanzadas para satisfacer las acreditaciones y normas nacionales o internacionales de calidad al mejorar la confianza de los resultados obtenidos. Este desarrollo ha tenido como consecuencia que los equipos e instrumentos comerciales tengan muy alto costo y/o sean de difícil acceso. A esto se suma que la mayoría de los equipos usados y propuestos en la literatura emplean software y circuitos electrónicos complicados para adquirir datos; lo anterior en conjunto impide su uso en trabajos de campo y en el aprendizaje de la química.

En la aplicación de la química, los altos costos no se limitan a equipos e instrumentos, sino que también se aplican a los diferentes materiales y sustancias que son indispensables y que se requieren en cantidades suficientes para poder proceder a la experimentación, lo que reduce

notablemente las posibilidades de experimentación fuera de un laboratorio. Sin embargo, el trabajo experimental es esencial en el aprendizaje integral de la química en particular y muchas escuelas no cuentan con laboratorios o donde los hay, están desprovistos de los equipos, materiales y sustancias necesarias. (Valdez Aragón, 2004)

### **1.1 Química Analítica a Microescala Total. Principios.**

La química a microescala es un conjunto de técnicas que reducen al mínimo la escala de los componentes utilizados de manera convencional para realizar un experimento exitoso en el área de la química. En recientes años, la química a microescala ha demostrado ser muy útil en varias áreas. (García-Mendoza, Marín-Medina y Baeza, 2014)

Pero la reducción del tamaño de los componentes es sólo una parte de la química a microescala la otra, la constituyen el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías que se adapten a la reactividad química en la nueva pequeña escala.

La totalidad de los libros de texto publicados en Química a Microescala están dirigidos a la enseñanza de la Química General en los primeros años universitarios y a nivel preuniversitario. Los temas tratados de Química

Analítica se limitan a las microtitulaciones ácido-base semicuantitativas de indicación del punto final con indicadores colorido. (Alejandro Baeza, Adrián de Santiago, Eduardo Galicia, 2005)

En el laboratorio donde se realizó esta tesis se ha desarrollado la línea de trabajo de Química Analítica a Microescala Total, que consiste en la implementación de materiales de bajo costo y de adquisición local para construir y utilizar de aparatos e instrumentos de medición electroquímica, enfocados al análisis de volúmenes de estándares y muestras de por lo menos 1 mL.

La idea principal de los métodos instrumentales a Microescala Total radica en medir una propiedad eléctrica: potencial, intensidad de corriente ó resistencia; con un multímetro conectado al binomio "sistema químico ↔ sensor" y correlacionar la respuesta eléctrica a las variaciones de concentración o de comportamiento químico de un analito y de esta forma darle un significado analítico a una respuesta eléctrica (Baeza Reyes, 2006).

La aplicación de esta línea de trabajo ha demostrado tener importantes ventajas en comparación a los métodos estándar de experimentación entre las que se pueden destacar:

- Disminución en el volumen requerido para el análisis de una muestra.
- Disminución en el gasto de solventes requeridos para el análisis de la muestra.
- Disminución en el espacio necesario para almacenar las sustancias e instrumentos requeridos para el experimento.
- Disminución en los riesgos para la salud por el manejo de sustancias peligrosas.
- Disminución en los costos del material y los instrumentos requeridos para la experimentación.
- Disminución en la generación de residuos por las dimensiones del experimento.
- Disminución en el costo y tiempo de reparación de los aparatos e instrumentos empleados.
- Mayor comprensión del funcionamiento de los instrumentos que se está llevando a cabo para la realización del análisis.

- La posibilidad de realizar experimentos fuera del laboratorio, ya sea para trabajo de campo o enseñanza en un aula.
- Los resultados obtenidos son equivalentes a los que se obtienen por métodos convencionales.

Uno de los principales problemas al trabajar a microescala se debe a la falta de equipos e instrumentos puesto que la mayoría de estos están fabricados para la realización de análisis que normalmente involucran volúmenes mayores a 1 mL. Asimismo, se debe considerar que el microescalamiento de equipos e instrumentos debe ser adecuado para el análisis que se desee realizar además de que su manejo y diseño deben permitir su uso fácilmente y en todo momento.

La destreza en el trabajo a microescala depende de la posibilidad de manejo de sustancias, materiales, instrumentos y equipos con la mayor eficiencia posible y es por esto que en esta tesis se propone el uso de técnicas de la línea de trabajo a microescala total, que: utilizan cantidades muy pequeñas tanto de sustancias como de solventes, permitiendo al mismo tiempo observar los fenómenos con la misma claridad que las técnicas convencionales, y que se combinan con el uso de recipientes que permitan usar volúmenes del orden de 300  $\mu\text{L}$  (por ejemplo placas de microtitulación), así como su respectivo acoplamiento a microsensores de pH, conductividad y absorbancia para

realizar ensayos que involucran mediciones potenciométricas, voltamperométricas y fotocolorimétricas para su aplicación en el trabajo de campo o la enseñanza de la química analítica.

La aplicación de técnicas de la línea de trabajo a microescala total en conjunto con las placas de microtitulación puede acoplarse a equipos que, debido a los múltiples pozos en las placas de microtitulación, pueden reducir el tiempo necesario para realizar diferentes análisis al tener la posibilidad de realizar en serie de gran número de los ensayos, que pueden ser de diferentes tipos, al preparar las disoluciones del análisis, que al colocarlas en los pozos de la placa de microtitulación y realizar la lectura de los resultados que el/los equipo(s) usados puedan acceder a cada disolución de manera continua y sin la necesidad de la limpieza del recipiente de análisis entre cada ensayo.

Otra ventaja que ofrece el uso de las placas de microtitulación en los análisis químicos es debida a trabajar con volúmenes máximos de 300  $\mu\text{L}$  por pozo, ya que las disoluciones a utilizar tienen que prepararse de manera que la concentración deseada para el análisis tenga un volumen igual o menor a los 300  $\mu\text{L}$ , por lo que, el uso de reactivos, analitos y solventes se ve reducido así como también la necesidad de espacio para su almacenaje, el riesgo por su manejo en caso de accidente, el costo del análisis y la generación de residuos, ventajas que también son el objetivo de la química a microescala total.

## **1.2. Objetivo general**

Realizar experimentos fotocolorimétricos, voltamperométricos y potenciométricos utilizando celdas de microtitulación y material de bajo costo para observar el comportamiento de sus resultados en volúmenes del orden de 300  $\mu\text{L}$  así como su aceptabilidad y practicidad en usos como la docencia o el trabajo de campo.

## **1.3. Hipótesis General**

Es posible realizar experimentos en los campos de fotocolorimetría, voltamperometría y potenciometría, acoplado equipo y material de bajo costo a placas de *microtitulación* para realizar ensayos que sólo requieren volúmenes menores o iguales a los 300  $\mu\text{L}$ , y dichos experimentos permitan obtener resultados equivalentes a los que se obtendrían si se utilizara equipo y materiales convencionales.



## Capítulo II. Antecedentes. QAMT. Principios teóricos.

### **2.1. Ley de Lambert-Beer- Bouger**

La espectrofotometría es el conjunto de técnicas analíticas cualitativas y cuantitativas que se basan en la absorción o la emisión de la radiación por las sustancias y consiste en medir la transmitancia ( $T_r$ ) o la absorbancia ( $A$ ) de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de  $l$  cm. Las regiones ultravioleta y visible del espectro se usan ampliamente en la determinación cuantitativa de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas.

Los espectrofotómetros funcionan con radiación monocromática que viaja a través de la muestra a analizar, con un espesor ( $l$ ) y concentración  $[i]$  conocidos; una luz incidente ( $I_0$ ) (de fotones que interactúan con las moléculas absorbentes de la muestra) llega con una luz transmitida ( $I$ ) diferente a un receptor de luz conectado a un sistema que interpreta la potencia de luz recibida. Esta interpretación permite la distinción de muestras absorbentes de luz, con iguales características, pero de distintas concentraciones, por medio de la comparación de las distintas potencias de luz que llegan al receptor de luz. La ecuación que relaciona todas esas

propiedades con la unidad de absorbancia es conocida como la Ley de Lambert-Beer-Bouger (ecuación 1).

$$A = -\log T_r = \log(I / I_0) = (R_i - R_r / R_0 - R_r) = \epsilon/[l] \dots \textbf{Ecuación 1}$$

La constante  $\epsilon$  [ $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ] es conocida como el coeficiente de absortividad molar y es una propiedad que no depende de la concentración de la sustancia.

La deducción de esta ecuación ha sido descrita por (García-Mendoza, Santiago-Zárate, & Baeza-Reyes, 2017) y puede ser consultada también en (Baeza Reyes, 2007).

La Ley de Lambert-Beer-Bouger establece que la absorbancia es proporcional al número de moléculas absorbentes. Se cuantifica la radiación absorbida en función de la concentración de las moléculas de analito y depende de la longitud que recorre el haz de luz en el medio de absorción. Esta ecuación representa un fenómeno lineal, es decir, al desarrollar un gráfico de absorbancia en función de la concentración se espera obtener una línea recta cuya pendiente corresponde al producto del coeficiente de absortividad molar y la longitud de paso óptico. Esta curva de calibración o patrón es la base de la aplicación de esta ley en el análisis cuantitativo de muestras y de mezclas.

- *2.1.1. Limitaciones reales de la Lambert-Beer-Bouger.*

La ley de Lambert-Beer-Bouger describe el comportamiento de absorción de medios que contienen concentraciones de analito relativamente bajas; en este sentido, es una ley restrictiva. A concentraciones altas (casi siempre 0.01 M), el grado de las interacciones soluto-solvente, soluto-soluto, o los puentes hidrógeno pueden afectar el ambiente del analito y en consecuencia capacidad de absorción. Esto se debe, a concentraciones altas, la distancia promedio entre las moléculas y iones responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada partícula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Estas interacciones soluto-soluto modifican la capacidad del compuesto para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, surgen desviaciones respecto a la relación lineal entre la absorbancia y la concentración. A veces se observa un efecto similar en medios que contienen concentraciones bajas de absorbente, pero concentraciones altas de otras especies, sobre todo electrolitos. La cercanía entre los iones y el compuesto absorbente altera la absorptividad molar de este último, debido a las interacciones electrostáticas; este efecto se reduce mediante dilución. Aunque el efecto de las interacciones moleculares no es importante a concentraciones

inferiores a 0.01 M, aparecen algunas excepciones entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes. También puede haber desviaciones de la ley de Lambert-Beer-Bouger porque la absorptividad depende del índice de refracción del medio. Por tanto, habrá un resultado erróneo si los cambios de la concentración causan alteraciones importantes en el índice de refracción de una solución.

- *2.1.2. Desviaciones químicas aparentes.*

Se producen desviaciones aparentes de la Lambert-Beer-Bouger cuando un analito se disocia, se asocia o reacciona con un solvente para originar un producto con un espectro de absorción diferente al del analito. Las soluciones acuosas de los indicadores ácido-base son un ejemplo característico de este comportamiento.

Por ejemplo, para un indicador  $\text{HIn}^-$ , su coloración característica no será igual que con su forma desprotonada  $\text{In}^{2-}$ , que tendrá otra coloración característica.

## **2.2. MIMC (micro colorímetro de mínima instrumentación).**

En los últimos años se ha visto una evolución en la precisión y el grado de sofisticación disponible en los espectrofotómetros de transmisión y reflectancia, cuya operación ahora está en gran medida automatizada, con un control general de los datos de entrada y salida a través de una interfaz de computadora (O'Toole & Diamond, 2008).

En los laboratorios de diagnóstico clínico, los análisis colorimétricos generalmente emplean analizadores complejos y costosos que requieren grandes suministros de energía. Aunque estos instrumentos están automatizados, todavía existe la necesidad de desarrollar dispositivos simples, pequeños y livianos, de bajo costo y portátiles para el análisis de rutina, particularmente en los campos clínicos y ambientales (Sorouraddin & Saadati, 2010).

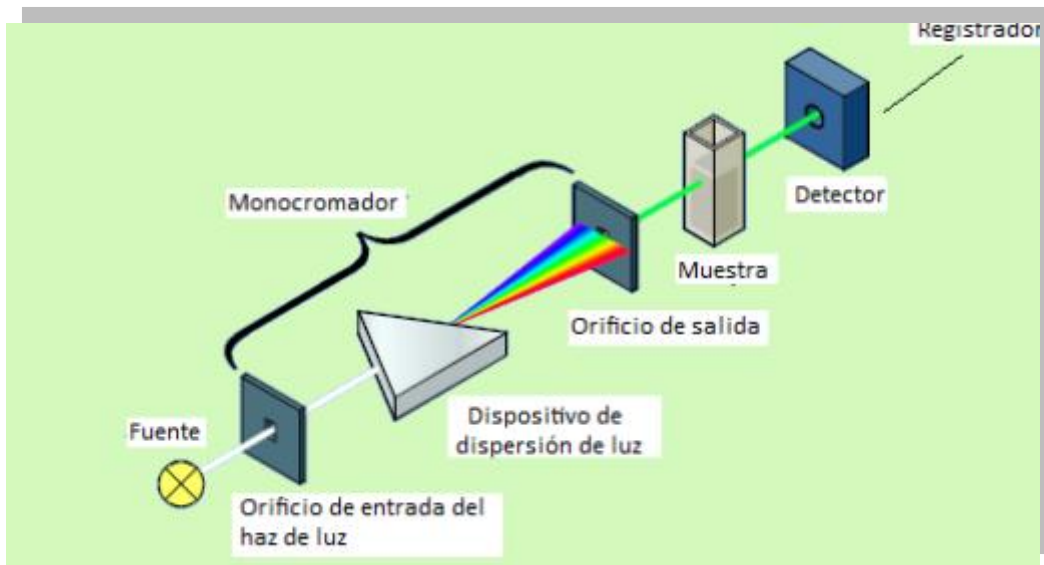
La  $\mu$ colorimetría de mínima instrumentación (MIMC) se realiza con un equipo construido con materiales de bajo costo (por ejemplo, leds, cables de cobre, caimanos, multímetro, etc.) y adquisición local para la realización de experimentos ópticos con volúmenes de muestras de analito colorido o de por lo menos 1mL. Estos análisis por MIMC dan

resultados basados en la intensidad de luz y que permiten ser relacionados con las concentraciones en las muestras, y que han sido equivalentes a los resultados con los equipos convencionales.

Los cuatro componentes fundamentales para un espectrofotómetro son:

- La fuente.
- El monocromador.
- La celda.
- El detector.

Estos componentes se relacionan como se muestra en la figura 1.



*Figura 1: Componentes fundamentales de un espectrofotómetro (Owen, 1996).*

El prototipo de MIMC utilizado en este trabajo consiste de las siguientes partes:

- *2.2.1. Fuente de luz.*

En las últimas décadas las industrias electrónicas han ofrecido una gran variedad de dispositivos que tienen ventajas considerables cuando se aplican en instrumentaciones dedicadas al campo de la química. Entre ellos, los diodos emisores de luz (LED), son de un gran interés en las aplicaciones analíticas y se utilizan como fuentes de luz en dispositivos de absorción portátiles y miniaturizados (Sorouraddin, Saadati, & Samadi, 2010).

Los LED, en comparación con las fuentes de luz convencionales, ofrecen varias ventajas como son:

- Dimensiones pequeñas.
- Requisitos de baja potencia.
- Alta eficiencia.
- Alta fiabilidad.
- Bajo autocalentamiento.

- Alta frecuencia de conmutación.
- Alta resistencia a los golpes.

En contraste con las fuentes de luz existentes en aplicaciones optoelectrónicas los LED ofrecen las siguientes ventajas:

- Una mayor vida útil.
- Bajo costo.
- Menor consumo de energía.
- Mayor brillo.
- Construcción robusta.
- Configuración flexible.
- Pureza espectral mejorada.
- Tamaño pequeño.
- Amplitud de espectro (los LED en el intervalo espectral de 247-1550 nm están disponibles comercialmente (Khanfar, Al-Faqheri, & Al-Halhouli, 2017)).



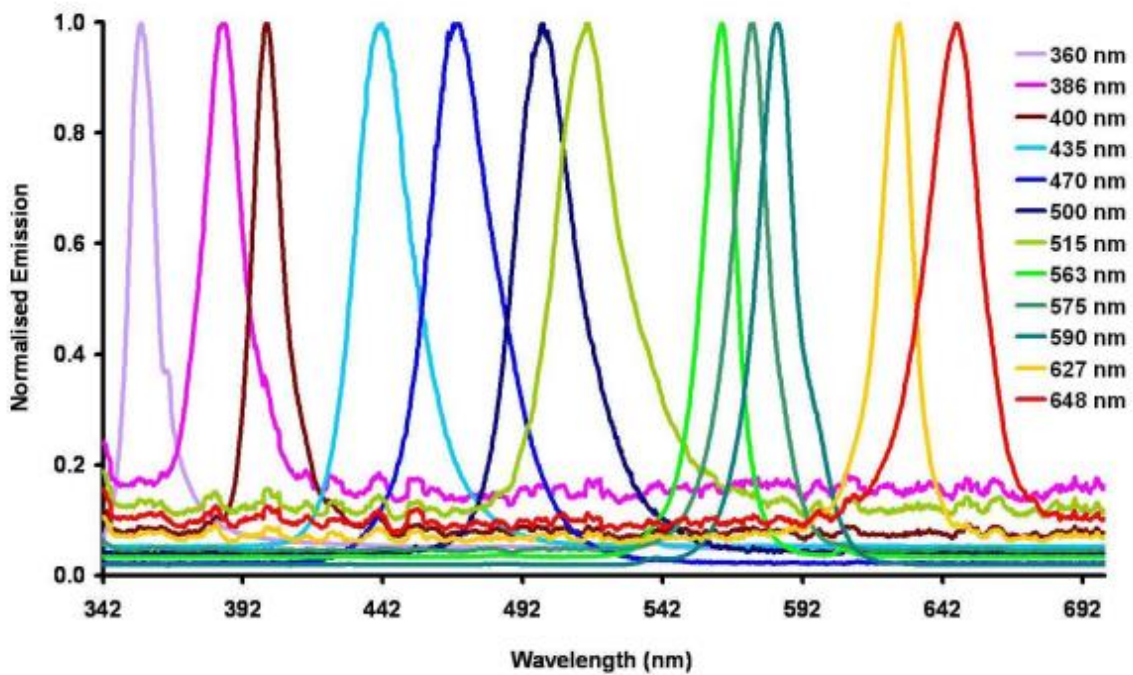
Los LED también tienen la capacidad de acoplarse a una gran variedad de detectores, como los arreglos de fotodiodo (PDA), los tubos fotomultiplicadores (PMT), las resistencias dependientes de la luz (LDR), los fototransistores (PT), etc. (O'Toole & Diamond, 2008).

Todas estas propiedades hacen que el LED sea un dispositivo adecuado y confiable para su uso en los análisis espectrofotométricos como fuente de luz ya que cuenta con un potencial considerable para su utilización en la adaptación y miniaturización de equipos como se requiere en MIMC.

- *2.2.2. Monocromador.*

Los monocromadores son dispositivos que se utilizan para seleccionar una longitud de onda en forma continua.

Los LED han tenido aplicaciones preferentes como sensores ópticos y el desarrollo en su proceso de fabricación ha resultado en LEDs de alta potencia y pureza espectral. En la siguiente figura se muestra algunas de las regiones espectrales UV-visible cubiertas por la luz de los LEDs disponibles comercialmente.



*Figura 2: Ejemplos del intervalo espectral UV-visible abarcado por una variedad de LEDs disponibles comercialmente. (O'Toole & Diamond, 2008).*

En este trabajo se cuenta con un LED tricolor (figura 3) que abarca los colores; rojo (648 nm), verde (563 nm) y azul (470 nm). Con fines de mantener la mínima instrumentación y el bajo costo, la monocromación de la luz se da por hecho debido a la alta potencia y pureza espectral propias al LED.



*Figura 3: LED tricolor; rojo, verde y azul.*

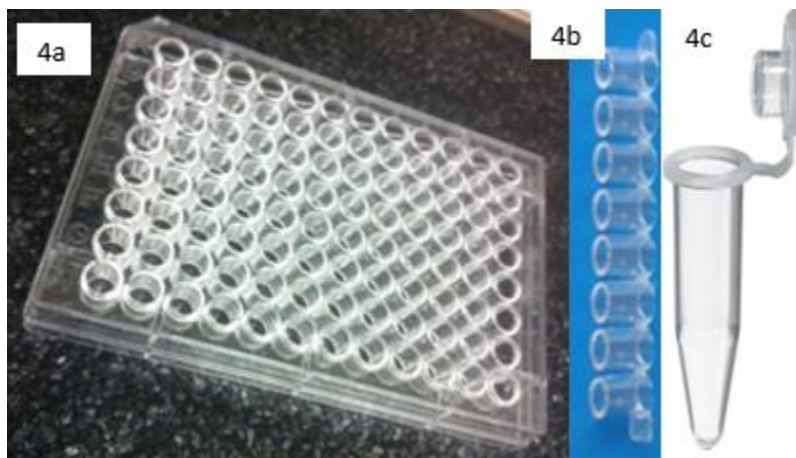
- *2.2.3. Celda.*

Las placas de microtitulación o microplaca de titulación, se caracterizan por tener múltiples pozos que van desde el pozo individual hasta los 1536 pozos. Las placas más usadas son las que cuentan con 96 pozos y con un volumen máximo de 300  $\mu\text{L}$  que generalmente son utilizados como pequeños tubos de ensayo.

Estas placas cuentan con marcas alfanuméricas para la identificación de todos sus pozos y existen diseños que cuentan con rebordes altos, pozos de fondo plano, redondo, en forma de v, etc. Son utilizadas principalmente en el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en laboratorios de diagnóstico o en investigación clínica.

Las microplacas se fabrican en diversos materiales. El más común es el poliestireno, utilizado para la mayoría de microplacas de detección óptica. Puede ser de color blanco por la adición de dióxido de titanio para una detección de absorbancia óptica o luminiscencia, o de color negro por la adición de carbón para ensayos biológicos de fluorescencia.

Asimismo existen las microplacas que transmitan la luz ultravioleta para su uso en ensayos o pruebas de nuevo desarrollo hechas a base de cicloolefinas (Patent No. WO 2017/034954 A1, 2017).



*Figura 4: Recipientes utilizados. A la izquierda una placa de microtitulación o microplaca de titulación de 96 pozos (4a), al centro una tira de pozos de 300  $\mu$ L desmontables (4b) y a la derecha un tubo de PCR (4c).*

En este trabajo, la celda utilizada es una placa de microtitulación de poliestireno con 96 pozos (figura 4<sup>a</sup>), aunque hay también de 8 pozos (figura 4b). Cada uno tiene una capacidad máxima de 300  $\mu$ L y se pueden agregar volúmenes en intervalos de 20  $\mu$ L con una jeringa de insulina de 1.0 mL. Esta placa es plana y lisa, lo que minimiza la reflexión de la luz en la superficie del recipiente. Debido a los requerimientos de los distintos ensayos, se decidió usar principalmente placas de microtitulación, aunque dados los requerimientos de ciertos ensayos también se utilizaron tubos de PCR de 500  $\mu$ L (figura 4c).

- 2.2.4. *Detector.*

Por ser de fácil adquisición local, de dimensiones pequeñas, sencillas y de bajo costo, así como su capacidad de acoplamiento con los LEDs se escogió la resistencia dependiente de la luz (LDR) como detector en el equipo (figura 5).

Las LDR, fotorresistencia o fotorresistor es un componente electrónico cuya resistencia disminuye con el aumento de intensidad de la luz incidente. En este caso la radiación óptica aporta la energía necesaria para aumentar el número de electrones libres (efecto



*Figura 5: Fotorresistencia convencional (LDR).*

fotoeléctrico) disminuyendo la resistividad. Los materiales fotosensibles más utilizados en la fabricación de una DLR son el sulfuro de talio, el sulfuro de cadmio y el sulfuro de plomo. Estos materiales se colocan encapsulados en vidrio o resina.

Dentro de las características importantes de las fotorresistencias cabe destacar el amplio intervalo de longitudes de onda de luz a los que son sensibles, es decir, la respuesta espectral va desde la luz infrarroja, pasando por la luz visible y hasta la región ultravioleta. Las LDR presentan un retardo en la variación del valor resistivo, siendo diferente si se pasa de oscuridad a luminosidad o de luminosidad a oscuridad. Debido a este retardo la LDR no se debería utilizar en aquellas aplicaciones donde la señal luminosa varíe muy rápidamente (tiempos de respuesta inferiores a una décima de segundo) (Serna Ruiz, García Ros y Noguera Rico, 2010).



*Figura 6: Gráfico que ilustra el comportamiento de la resistencia de una LDR, en función de la intensidad luminosa incidente.*

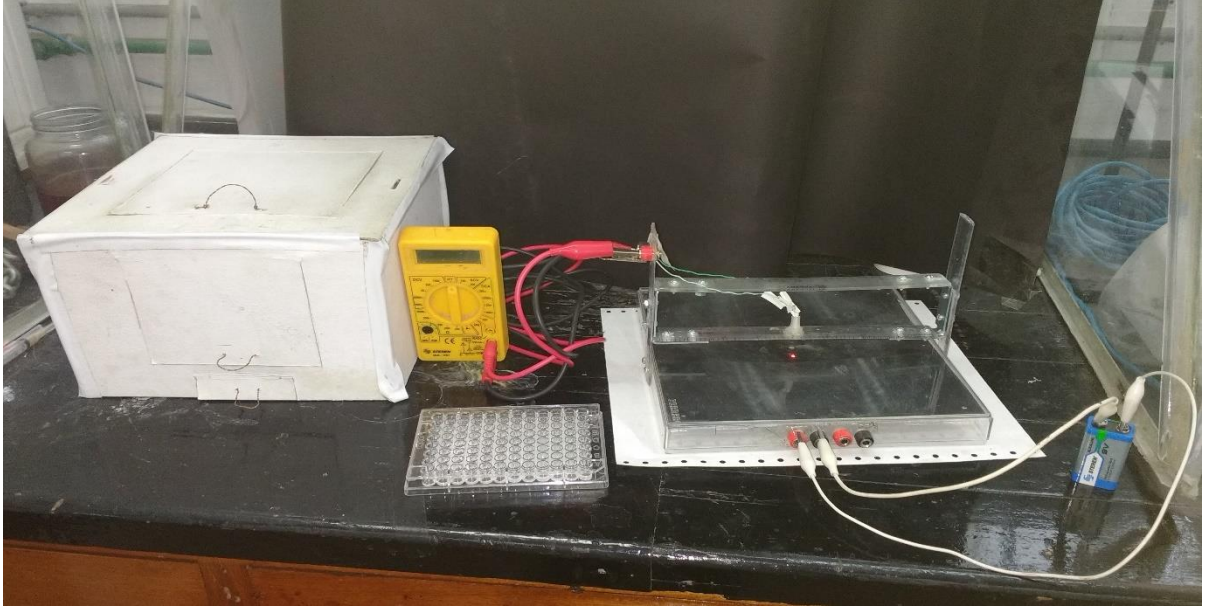
Los valores de resistencia para una LDR son altos cuando no hay iluminación y bajan dependiendo de la intensidad de luz incidente sobre ella. La relación entre la resistencia ( $R$ ) de una LDR y la intensidad luminosa ( $L$ , en lux) recibida, es inversa como se muestra en figura 6..

- *2.2.5. Diseño del MIMC.*

El equipo se fabrica a partir de una base de acrílico negro. En el centro de esta base, hay una pequeña ranura que conecta la parte superior con la inferior y es donde se fija el LED que será la fuente de luz del sistema. Este LED se conecta (por medio de alambres de cobre) a cuatro Jacks que están un costado de la base de acrílico y lo cuales a su vez se conectarán, por medio de caimanes, a la pila que es la fuente de energía del LED. Sobre dos costados de la base, se ubica un soporte de plástico a cada lado y mediante dos pequeñas ménsulas se coloca un tercer soporte entre los dos primeros, el cual tiene la función de sostener (por medio de una ranura del tamaño adecuado) una fotorresistencia fija directamente encima del LED. La fotorresistencia se conectará a un multímetro, por medio de caimanes, con el cual se realizará el registro de datos. Se cubre todo el sistema para evitar el paso de la luz no deseada (figura 7).

Cabe mencionar que la atenuación del haz puede ocurrir como consecuencia de la dispersión causada por moléculas grandes y, a veces, porque lo absorben las paredes del recipiente. Para compensar todos estos efectos, la potencia del haz transmitido por la solución del analito se compara con la potencia del haz transmitido por una celda idéntica que contiene sólo solvente. Así, la transmitancia y absorbancia

experimentales se aproximan de manera notable a la transmitancia y absorbancia obtenidas con equipos convencionales.



*Figura 7: Estructura interna del prototipo de fotocolorímetro construido que se usó en este trabajo. A la izquierda carcasa utilizada para bloquear la luz ambiental.*

### - **2.3. Micro electroquímica. Voltamperometría.**

La voltamperometría es una técnica electroquímica que consiste en variar el potencial del electrodo de trabajo (se efectúa un barrido) mientras que la intensidad de corriente resultante se registra como una función del potencial aplicado. A este registro se le llama voltamperograma.

Si existe una especie electroactiva (que se pueda oxidar o reducir) se registrará una corriente cuando el potencial aplicado se vuelva



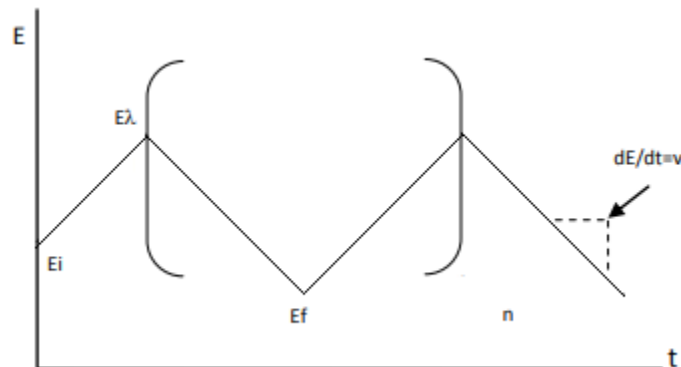
suficientemente negativo o positivo para que esa especie se electrolice. En caso de que una solución se diluida, la corriente alcanzará un valor límite porque el analito sólo puede difundir hacia el electrodo y electrolizarse con una rapidez finita, dependiendo de su concentración.

Una celda voltamperométrica requiere un microelectrodo de trabajo, electrodo auxiliar y un electrodo de referencia. En mediciones habituales se emplea un potencióstato para controlar el potencial. La intensidad de corriente en el electrodo de trabajo se registra en función de su potencial medido con respecto al electrodo de referencia, sin embargo, la diferencia de potencial solo se aplica entre los electrodos de trabajo y auxiliar, y por tanto la corriente únicamente pasa también entre estos dos últimos.

Se tiene que tener en cuenta que el registro del potencial se puede ver afectado. La ley de Ohm establece que el voltaje es igual al producto de la corriente por la resistencia:  $E=iR$ , donde  $i$  es la corriente en amperios y  $R$  es la resistencia en ohmios. Cuando la corriente fluye, el potencial registrado se distorsiona (se desplaza) en una cantidad igual a  $i \times R$ , donde  $R$  es la resistencia de la solución. Si la contribución de este desplazamiento es significativa origina que la curva de la corriente-potencial se distorsione y se prolongue sobre un intervalo de potencial más grande (Gary, 2009).

Una de las técnicas que se realiza con una celda de tres electrodos es la voltamperometría cíclica que consiste en el registro de una corriente

causada por un potencial que varía linealmente primero hasta alcanzar un valor extremo (potencial de inversión) y desde este punto, el sentido del barrido se invierte hasta que el potencial alcance su valor original (figura 8). La velocidad del barrido en ambas direcciones es constante y este ciclo puede repetirse varias veces.



*Figura 8: Programa de perturbación para voltamperometría de barrido triangular a n ciclos (Baeza reyes & García Mendoza, 2011).*

Mediante esta técnica se puede electrolyzar una especie e invertir el potencial para comprobar la formación de su par redox, y de esta manera es posible dilucidar mecanismos de reacción. Al variar la velocidad de barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en los procesos redox. Si se analiza una muestra con dos o más analitos presentes, su comportamiento es particular, por lo que el voltamperograma resultante no es necesariamente la suma de los voltamperogramas individuales de cada analito (Baeza Reyes & García Mendoza, 2011).

Las variables importantes en un voltamperograma cíclico son el potencial de pico catódico  $E_{pc}$ , el potencial de pico anódico  $E_{pa}$ , la corriente catódica del pico  $i_{pc}$  y la corriente anódica pico  $i_{pa}$  (figura 9).

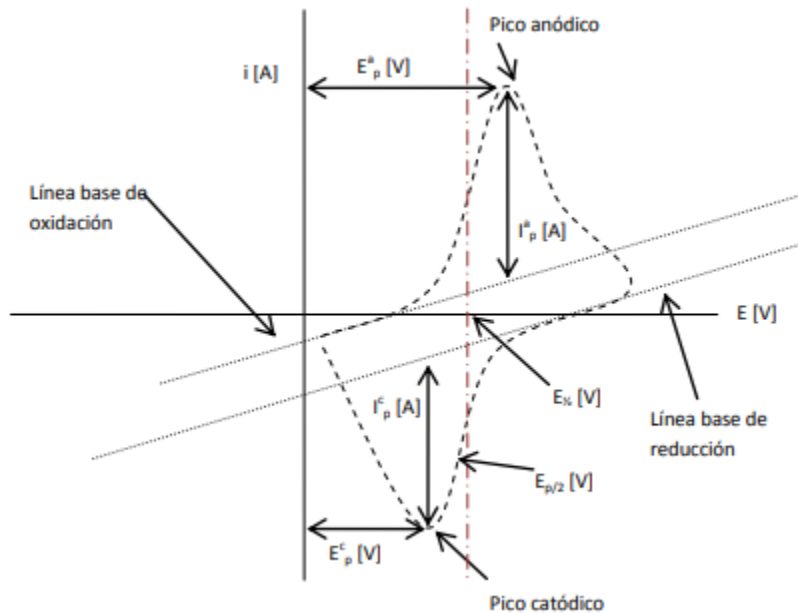


Figura 9: Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo con el convenio planteado por la IUPAC (Baeza Reyes y García Mendoza, 2011).

En voltamperometría cíclica, la ecuación Randles-Sevcik (ecuación 2), permite evaluar el efecto de la velocidad de barrido sobre el pico de corriente. Para una reacción redox simple, la corriente de pico depende tanto de la concentración y las propiedades de difusión de las especies electroquímicas involucradas como también de la velocidad de barrido donde se trabaja.

$$i_p = 0.4463nFa[i]((nFvD)/(R_aT))^{1/2} \dots\dots\dots\textbf{Ecuación 2}$$

donde:

- |  |   |
|--|---|
| $i_p$ = Corriente limite en amperios               | $D$ = Coeficiente de diffusion<br>( $\text{cm}^2/\text{s}$ )      |
| $n$ = Número de electrones transferidos            | $R_a$ = Intervalo de escaneo (V)                                  |
| $F$ = Constante de Faraday                         | $R$ = Constante del gas ideal ( $\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) |
| $a$ = Área del electrodo en $\text{cm}^2$          | $T$ = Temperatura (k)   |
| $[i]$ = Concentración ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) |   |

Para está técnica, este proceso de difusión es dependiente del gradiente de concentración del analito cerca del electrodo, en otras palabras, el gradiente de concentración, en turno, es afectado por la concentración de especies al electrodo, y que tan rápido pueden difundir a través de la disolución. Al cambiar el potencial de la celda, la concentración de las especies al electrodo también cambia. Por lo tanto, un barrido de voltaje rápido causa un gran gradiente de concentración cerca del electrodo, resultando en una corriente alta.

Se dice que, en una reacción electroquímica, que se comporta como lo predice la ecuación de Randles-Sevick, es un proceso controlado por difusión y de cinética rápida al electrodo. Esto es una primera evidencia de que no hay reacciones químicas acopladas, (lo anterior es una

condición necesaria pero no suficiente). Así, para una reacción electroquímica, la corriente de pico seguirá un comportamiento lineal con la velocidad de barrido según,  $v^{1/2}$ , o bien con respecto a la concentración analítica en el seno de la disolución.

Las gráficas de  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  son evidencia de un proceso redox reversible en comparación con los casos donde el analito sufre cambios estructurales. Cuando se conoce el coeficiente de difusión de las especies, o puede ser estimado, estas gráficas pueden proveer información de la estequiometría del proceso redox.

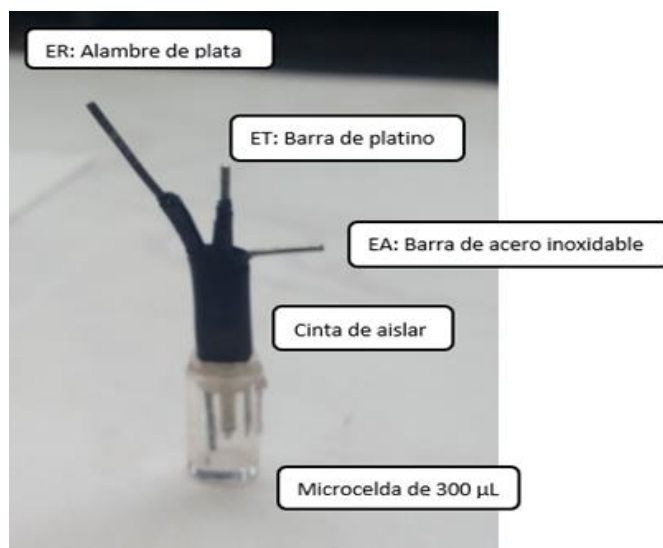
La aplicación principal de la voltamperometría cíclica es como una herramienta para estudios básicos y diagnósticos que proporciona información cualitativa sobre procesos electroquímicos en diversas condiciones (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

## - **2.4. MIMP. (micro polarógrafo de mínima instrumentación)**

- *2.4.1. Características del sistema de análisis: MIMP y Potenciostato*

Para la obtención de curvas voltamperométricas se utilizaron dos diseños diferentes de equipos:

- 1) El primer equipo consiste en la utilización de un MIMP (micro polarógrafo de mínima instrumentación) acoplado a una microcelda para el análisis de disoluciones. La información sobre el funcionamiento de un MIMP y sus características ha sido descrita por Vilaso, Arada, Baeza y Cespedes en 2016.
- 2) En el segundo diseño de equipo se utilizó un potenciostato BAS (Bioanalytical Systems) CV-27 Voltammograph acoplado a una microcelda distinta para efectuar diferentes análisis (figura 10).



*Figura 10: Microcelda y electrodos utilizados en el potenciostato BAS (Bioanalytical Systems) CV-27 Voltammograph.*

En ambos diseños el sistema de análisis consiste de una microcelda constituida por un pozo de microtitulación en el cual se colocan tres barras (dependiendo del diseño se usa acero inoxidable, grafito, plata y/o platino) lo suficientemente pequeñas para que entren juntas (figura 10). Estas barras tienen la función de actuar como electrodos por lo que el material de cada una es adecuado para este propósito y en este caso varía dependiendo del experimento a realizar.

En la microcelda del primer diseño de equipo, se utilizó una barra de grafito como electrodo de trabajo y dos barras acero inoxidable (agujas de jeringas) como electrodo auxiliar y de referencia. Para la unión entre estos se utilizó cinta de aislar, enrollando cada uno por separado y

después envolviéndolos juntos de tal manera que no hubiera ningún contacto entre ellos, pero estuvieran lo más cerca posible uno del otro, al mismo tiempo que se cuidó que sus extremos estuvieran descubiertos para que por una parte los tres se puedan poner en contacto con las disoluciones y por la otra se pueda conectar al equipo a utilizar (figura 11).

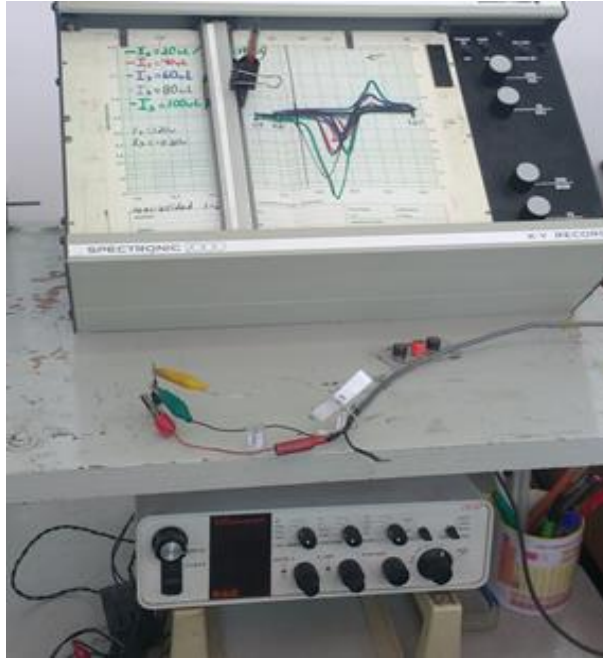


*Figura 11: Microcelda acoplada a un MIMP.*

En el segundo diseño de equipo se ocupó un alambre de plata como electrodo de referencia, un alambre de platino como electrodo de trabajo y una barra de acero inoxidable (aguja de jeringa) como electrodo auxiliar. Para la unión entre estos se utilizó cinta de aislar como se hizo para el sistema anterior. Adicionalmente al electrodo de trabajo se le cubrió con la punta ya cortada de una micropipeta de 500  $\mu\text{L}$  de tal forma



que cuando se sumerja en la disolución solo la parte inferior de la punta del electrodo quede en contacto con la disolución a analizar (figura 12).



*Figura 12: Microcelda acoplada a él potenciostato BAS CV-27 Voltammograph.*

Para ambos diseños de equipo se utilizó una jeringa de 1 mL para dosificar las disoluciones a estudiar.

## **2.5. MIMISE. (*microelectrodo de ion selectivo de mínima instrumentación*)**

Los métodos potenciométricos de análisis se basan en las mediciones del potencial de celdas electroquímicas en ausencia de corrientes apreciables. Las técnicas potenciométricas se han utilizado para detectar los puntos finales de las titulaciones. En fechas más recientes las concentraciones de iones se miden directamente a partir del potencial de un electrodo de membrana selectiva de iones en los que el potencial de membrana es selectivo hacia uno o varios iones dados, del mismo modo en que el potencial de una membrana de vidrio de un electrodo convencional es selectivo hacia los iones hidrógeno. Dado que ninguno de estos electrodos es específico para un ion dado, se les llama electrodos selectivos de iones (ISE). (Skoog et al., 2008)

Los electrodos selectivos de iones son fundamentalmente diferentes de los electrodos metálicos debido a que los electrodos selectivos no involucran procesos redox. Lo que caracteriza a un electrodo selectivo de iones ideal es que tiene un recubrimiento delgado que es capaz de responder únicamente a un ion en particular sin importar la presencia de otros iones, además un ISE responde con rapidez y de manera

reproducibile a los cambios de actividad del ion analito. Pero también hay desventajas en las soluciones reales, por ejemplo, existen iones que interfieren o envenenan ciertos electrodos. Algunos electrodos son frágiles y tienen un límite de vida media.

Los electrodos selectivos responden linealmente al logaritmo de la actividad del analito en un intervalo de hasta seis órdenes de magnitud. Debido a que usualmente se desea conocer concentraciones, no actividades, una sal inerte se usa frecuentemente para brindar a todos los estándares y muestras una alta y constante fuerza iónica. Si los coeficientes de actividad son constantes, el potencial del electrodo puede ser correlacionado linealmente con la concentración (C. Harris, 2007).

La respuesta de los ISE con frecuencia es lenta, y se debe tomar un tiempo considerable para establecer una lectura al equilibrio. En general, la respuesta se vuelve más lenta al disminuir la concentración. Sin embargo, algunos electrodos responden con suficiente rapidez y se usan para monitorear la rapidez de reacción. Algunas de las ventajas, desventajas, precauciones y limitaciones en el uso de los ISE se describen a continuación:

- 1) Miden actividades más que concentraciones, ventaja única, aunque un factor que se debe tener en cuenta es la interferencia por efectos de la fuerza iónica.

- 2) Miden iones "libres", por tanto, la interferencia química puede ocurrir por complejamiento, protonación y otras reacciones.
- 3) No son específicos sino simplemente más selectivos hacia un ion particular. Por tanto, están sujetos a interferencia de otros iones. Responden a los iones hidrógeno, y por tanto se encuentran limitados por el pH.
- 4) Funcionan en soluciones turbias o coloridas donde fallan los métodos fotométricos.
- 5) Tienen una respuesta logarítmica, lo cual da un amplio intervalo dinámico de trabajo, por lo general de cuatro a seis órdenes de magnitud. Esta respuesta logarítmica también da como resultado un error constante dentro del intervalo de trabajo en el que es válida la relación de Nernst.
- 6) Salvo en solución diluida, su respuesta es bastante rápida, y a menudo necesita menos de 1 minuto de medición. La respuesta del electrodo con frecuencia es lo suficientemente rápida como para permitir el proceso de monitoreo de una corriente.
- 7) La respuesta depende de la temperatura al estar incluida en el término  $RT \ln F$ .
- 8) El equipo de medición necesario se puede hacer portátil para operaciones de campo, y se pueden medir pequeñas muestras (por ejemplo, de 1 mL).
- 9) La muestra no se destruye en la medición.

10) Aunque ciertos electrodos pueden operar con concentraciones tan bajas como  $10^{-6}$  M, muchos no pueden, los electrodos no son herramientas ultrasensibles como algunas otras técnicas que pueden alcanzar sensibilidades de  $10^{-9}$  M o menores.

11) Por lo general se necesita una calibración frecuente.

12) Hay disponibles pocos estándares primarios de actividad y las soluciones estándar que se usan no están "amortiguadas" en el ion que se está midiendo por lo que las impurezas, especialmente en estándares diluidos, pueden ocasionar resultados erróneos (Gary, 2009).

En general se han empleado cristales de sales inorgánicas poco solubles como elemento sensor químico como puede verse en la siguiente tabla:

*Tabla 1. Ejemplos de ISE. Se menciona a que son sensibles, de que están hechos y los interferentes que los afectan (Baeza, 2015).*

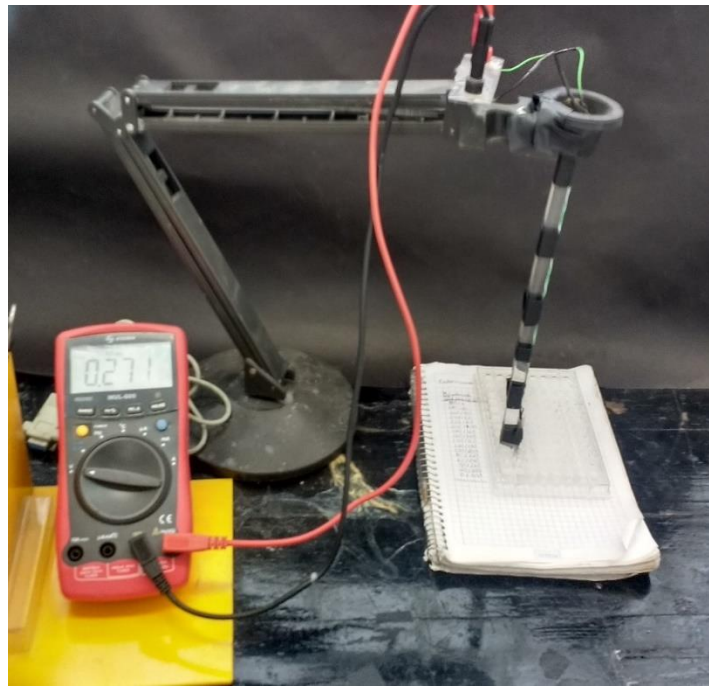
<i>ION DIANA</i>	<i>MATERIAL SELECTIVO</i>	<i>INTERFERENCIAS</i>
<i>FLORUROS</i>	CRISTAL DE FLORURO DE LANTANO	HIDROXILOS
<i>CLORUROS</i>	CLORURO DE PLATA	HALOGENUROS, CIANUROS, AMONIACO DITIONATO, SULFUROS
<i>BROMUROS</i>	BROMURO DE PLATA	CIANUROS, SULFUROS
<i>YODUROS</i>	YODURO DE PLATA	CIANUROS, SULFUROS
<i>CIANUROS</i>	YODURO DE PLATA	YUDUROS, SULFUROS
<i>SULFUROS</i>	SULFOCIANURO DE PLATA Y SULFURO DE PLATA	PLATA(I)
<i>PLATA (I)</i>	SULFURO DE PLATA	SULFUROS
<i>CADMIO(II)</i>	SULFURO DE CADMIO	ACIDOS, MANGANESO, PLOMO, FIERRO, DICROMATO
<i>PLOMO(II)</i>	SULFURO DE PLOMO	COBRE, CADMIO
<i>COBRE(II)</i>	SULFURO DE COBRE	COBRE(I)
<i>TALIO (I)</i>	MOLIBDOFOSFATO DE TALIO EN RESINA EPOXICA	NINGUNA

- *2.5.1. Equipo para la detección de iones  $H^+$*

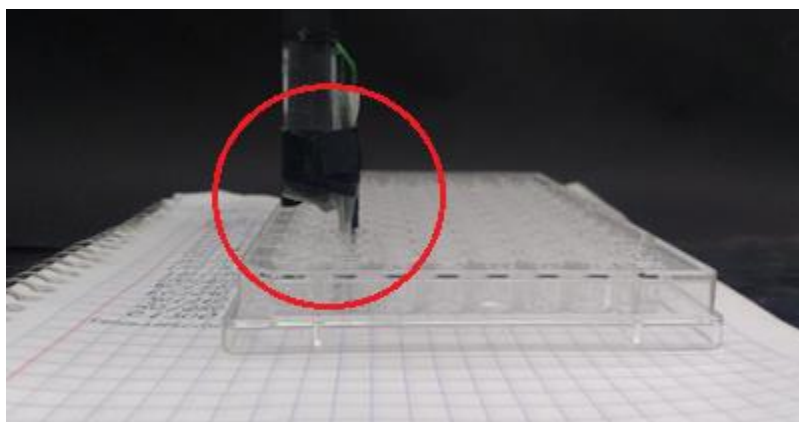
Las titulaciones ácido-base para análisis químico o estudio de procesos en solución se ve limitada por el alto costo de los sensores de pH a base de membrana de vidrio combinados con electrodos de calomel saturado. Además, el tamaño de estos electrodos exige la utilización de celdas de reacción de volúmenes iguales o mayores a 30 mL. Desde la década de los años 50 se han desarrollado nuevos sensores de pH utilizando los óxidos metálicos de Fe, Sb, W y películas de óxidos metálicos sobre acero inoxidable. Estos materiales son de fácil adquisición en forma de alambres de diámetro pequeño (Baeza, 2003).

El acoplamiento de microsensores a la placa de microtitulación para la medición de pH en los ensayos de potencial está constituido de un alambre de  $W^0$  como el caso del electrodo de trabajo y de un microelectrodo de Ag sumergido en una disolución saturada de KCl como electrodo de referencia (figura 14). Estos electrodos están conectados por caimanes y jacks a un multímetro y en el otro extremo están unidos a un tubo de acrílico rígido que está montado en un brazo de plástico que provee de la rigidez y las suficientes articulaciones para permitir el

movimiento de los electrodos de forma cómoda. El equipo armado se muestra en la siguiente figura:



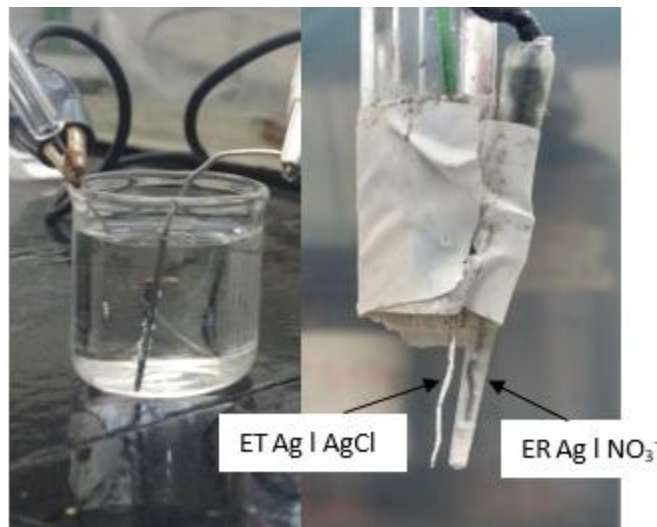
*Figura 13: Potenciómetro constituido materiales de bajo costo, utilizado en este trabajo.*



*Figura 14: Acercamiento de la figura 13. Electrodos usados en la medición del pH.  $W^0$  para el caso del electrodo de trabajo y de un microelectrodo de Ag sumergido en una disolución saturada de KCl para el caso del electrodo de referencia.*

- 2.5.2. Equipo para la detección de iones  $Cl^-$ .

Para la detección de iones cloruro se mantuvo el diseño descrito anteriormente, cambiando los electrodos a utilizar. Como electrodo de trabajo se utilizó alambre de plata recubierto por una delgada capa de cloruro de plata, para el electrodo de referencia se usó un alambre de plata en una disolución de  $KNO_3$  saturada (figura 15).



*Figura 15: Proceso de recubrimiento. El alambre de plata se sumerge en una disolución de  $HCl$   $0.1$  M para recubrirlo de  $AgCl$ .*

Para generar el recubrimiento del electrodo de trabajo se usó una celda electroquímica con  $HCl$   $0.1 \frac{mol}{L}$  y con un cargador de celular Samsung



como fuente de poder. Debido a la baja solubilidad del cloruro de plata el potencial del electrodo estará dado por la ecuación de Nernst:

$$E_{\text{AgCl}|\text{Ag}} = E^0_{\text{AgCl}|\text{Ag}} - \frac{RT}{nF} \ln a_{\text{Cl}^-} \dots\dots\dots\text{Ecuación 3}$$

Donde:

- R: constante del gas ideal equivalente a  $8.3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
- T: temperatura absoluta, K
- n: número de electrones intercambiados
- F: constante de Faraday equivalente a  $9.6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
- $E^0_{\text{AgCl}}$ : potencial estándar para el par  $\text{AgCl}|\text{Ag}$
- $a_{\text{Cl}^-}$ : actividad del ion cloruro

Sustituyendo los valores anteriores, la expresión queda de la siguiente manera:

$$E_{\text{AgCl}|\text{Ag}} = 0.2224 - 0.0591 \log [\text{Cl}^-] \dots\dots\dots\text{Ecuación 4}$$

## Capítulo III/Resultados y análisis de resultados.

### **3.1. Curvas de calibración microfotolorimétricas.**

- 3.1.1. Objetivo particular.

Utilizar un prototipo de fotolorímetro acoplado a una placa de microtitulación para realizar curvas de calibración de las siguientes disoluciones coloridas; complejo  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_3)_2$ , reactivo de Biuret con albumina de huevo, reactivo de Drabkin con hemoglobina humana y reactivo de Karl-Fisher con agua.

- 3.1.2. Hipótesis particular.

En diferentes trabajos se demostrado la eficacia de las diferentes adaptaciones de equipo MIMC para determinar analitos coloridos (Martínez & Baeza, 2004),(García-Mendoza et al., 2017). Con base en esto, la reducción del volumen de la muestra para su análisis en una placa de microtitulación acoplada a un MIMC debería presentar curvas de calibración equivalentes a las que se obtendrían usando equipo convencional.

- 3.1.3. Materiales.

- Hidróxido de amonio, J.T. Baker, Lote M04C09,  $\text{NH}_4\text{OH}$  35.05 g  $\text{mol}^{-1}$

- Nitrato de cobre, SIGMA-ALDRICH, México, S.A., Lote 98F0817,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  187.6 g  $\text{mol}^{-1}$

- Luminol

- Ferrocianuro de potasio, R.A., Productos químicos monterrey, Lote 001327  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  422.39 g  $\text{mol}^{-1}$

- Hemoglobina humana, SIGMA-ALDRICH, Lote 069K7545, liofilizado, Almacenado de 2-8 °C

- Reactivo de Biuret estandarizado\*

- Reactivo de Drabkin estandarizado\*

- Reactivo de Karl Fischer estandarizado\*

- Peróxido de hidrogeno al 3%, Alcomex, Lote AO-09051801

- Albumina de huevo (polvo)

- Ferrocianuro de potasio, R.A., Productos químicos monterrey, Lote 001327  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  422.39 g  $\text{mol}^{-1}$

- Puntas de micropipeta automática

- Alambre de plata 1.0 mm de diámetro

- Alambre de acero inoxidable 1.0 mm de diámetro

- Alambre de platino 1.0 mm de diámetro

- Electrodo de tungsteno, color: verde, pureza > 99.8%

- Alambre de cobre convencional de grosor 3 mm
- Agua potable para realizar disoluciones y lavados pertinentes
- Ménsulas esquineras de 2 cm
- Jeringa plástica de insulina de 1.0 mL
- Placa de microtitulación de poliestireno fondo plano con 96 pozos, PF 1003-F
- Multímetro Steren Mul-010
- Potenciostato Bioanalytical Systems CV-27 Voltammograph
- LED (light emitting diode, diodo emisor de luz) de colores RGB, Conexión ánodo común, Diámetro: 5 mm, Intervalo de temperatura de operación: -40°C a 65°C
- Tubos PCR de 500  $\mu$ L
- LDR (light dependent resistor, resistencia dependiente de la luz) de 2 MOhms
- Pila de 9 volts marca ROCKET
- Cables con pinzas caimán
- Cables con pinza caimán y pin plátano
- Jacks tipo banana
- Acrílico
- Brazo de plástico articulado
- Cinta de aislar modelo PI-13 NE
- Teléfono celular

\*La preparación de estos reactivos Biuret, Drabkin y Karl Fisher se puede consultar respectivamente en:

Neelima Rajvaidya, Dilip Kumar Markandey (2006). Microbiology. APH Publishing corporation, 290.

Oscar William Schalm, Nemi Chand Jain, (1986). Schalm's Veterinary Hematology. Lea & Febiger, 44.

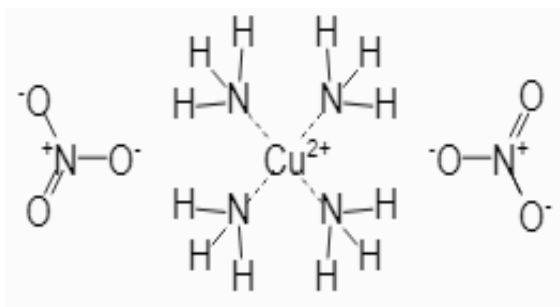
Eugen Scholz (2012). Karl Fisher Titration: Determination of Water. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo 1984.

- *3.1.4. Preparación de disoluciones*

- *3.1.4.1. Ensayos de la disolución colorida cobre-amoniaco.*

En la reacción  $\text{NH}_4\text{OH} + \text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \rightarrow [\text{Cu}(\text{NH}_3)_4](\text{NO}_3)_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$  los iones tetraamincobre (II) ( $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ ) (figura 16) presentan una coloración azul oscuro muy característica.

Para la recreación de una disolución con esta coloración y sin formación



*Figura 16: Estructura de la molécula nitrato de tetraamincobre (II)*

de precipitado se preparó una disolución stock a partir de 18.4 mg de nitrato de cobre que se disolvieron en 1 mL de agua destilada. Las disoluciones utilizadas en los ensayos se hicieron con una jeringa de insulina de 1 mL. Se tomaron volúmenes de 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{L}$  de la disolución stock y se colocaron en cinco diferentes pozos de la placa de microtitulación para después agregarles hidróxido de amonio hasta tener un volumen total de 300  $\mu\text{L}$  en cada pozo. Se tomaron las lecturas de resistencia lumínica en estos pozos incluyendo la lectura de un pozo adicional con 300  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amoniaco que fue utilizado como blanco en cada ensayo.

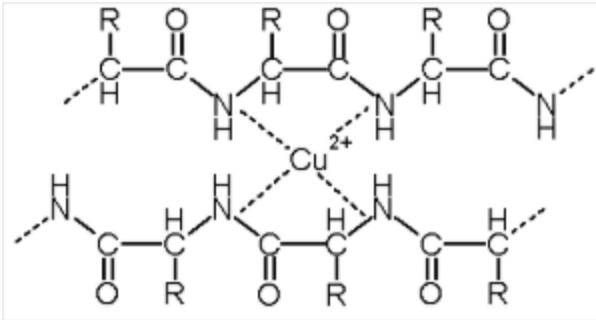
Todo el proceso anterior se repitió hasta tener 10 ensayos diferentes con seis lecturas cada uno.

○ *3.1.4.2. Ensayos de la disolución colorida del reactivo de Biuret.*

El Reactivo de Biuret es aquel que detecta la presencia compuestos con dos o más enlaces peptídicos en sustancias de composición desconocida. Se realiza en un medio básico y consiste en la formación de un complejo coloreado en el cobre y los grupos amino de los enlaces peptídicos (figura 17). La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la

cantidad de proteínas. Está hecho de hidróxido de sodio (NaOH) y sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>), junto con tartrato de sodio y potasio (KNaC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O).

En este ensayo se utilizó albúmina de huevo como proteína para utilizar con el reactivo de Biuret. Se tomó el reactivo de Biuret como blanco y se



*Figura 17: Complejo formado entre un ion cobre (II) y los grupos amino en una proteína.*

colocaron 300  $\mu$ L de este en uno de los pozos de la placa de microtitulación. En los siguientes cinco pozos se agregaron volúmenes de 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ L de una disolución de albúmina

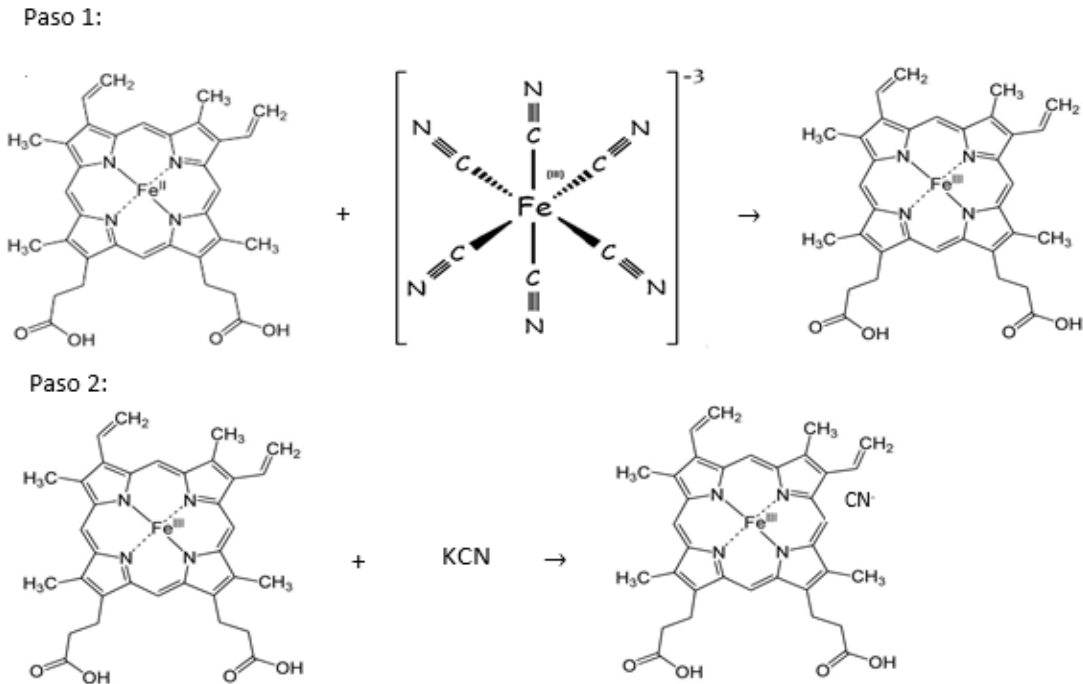
de huevo de concentración de 1 mg/mL y se agregó reactivo de Biuret hasta completar los 300  $\mu$ L en cada pozo.

Se tomaron las lecturas de estos pozos y se repitió todo el proceso anterior hasta tener 10 ensayos diferentes y seis lecturas de cada uno.

○ *3.1.4.3. Ensayos de la disolución colorida del reactivo de Drabkin.*

El método de Drabkin consiste en hacer reaccionar la sangre con un reactivo que contiene cianuro y ferrocianuro potásico (reactivo de Drabkin). Este reactivo oxida la hemoglobina a metahemoglobina (paso 1, figura 18) y que a su vez pasa a cianometahemoglobina (paso 2, figura

18); es la intensidad de color de este compuesto la que se mide fotocolorimétricamente.



*Figura 18: Reacción entre la hemoglobina y el reactivo de Drabkin. En el paso 1 se oxida la hemoglobina a metahemoglobina mediante el ferricianuro. En el paso 2 la metahemoglobina pasa a cianometahemoglobina mediante cianuro.*

En este ensayo, el reactivo de Drabkin se utilizó como blanco, colocándose 300  $\mu\text{L}$  en un pozo de la placa de microtitulación. En los siguientes pozos se colocaron 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{L}$  de una disolución de hemoglobina



y agua de concentración de 1 mg/mL y se llevaron hasta un volumen de 300  $\mu$ L con la disolución del reactivo de Drabkin.

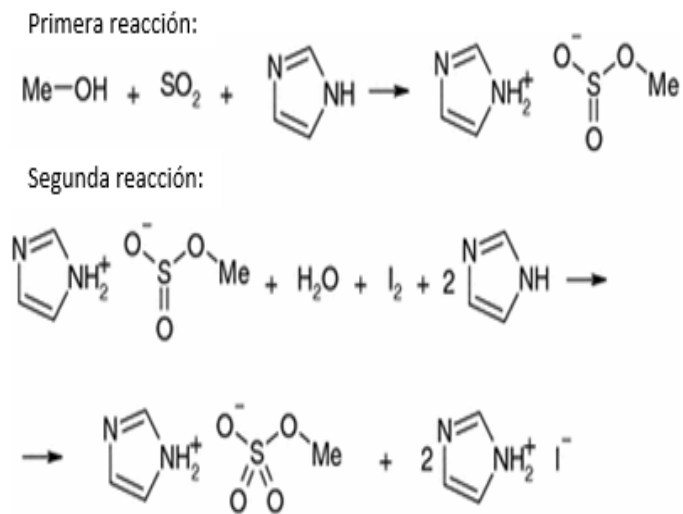
Se tomaron 6 veces las lecturas de estos pozos y se repitió todo el proceso anterior 10 veces.

- *3.1.4.4. Ensayos de la disolución colorida de la reacción Karl Fischer.*

La valoración de Karl Fischer es un método clásico usado en química analítica que utiliza una valoración coulombimétrica o volumétrica para determinar agua en muestras. La exactitud y precisión son tan grandes que se llega a utilizar para determinar humedad desde apreciables concentraciones hasta niveles de trazas de agua en las muestras.

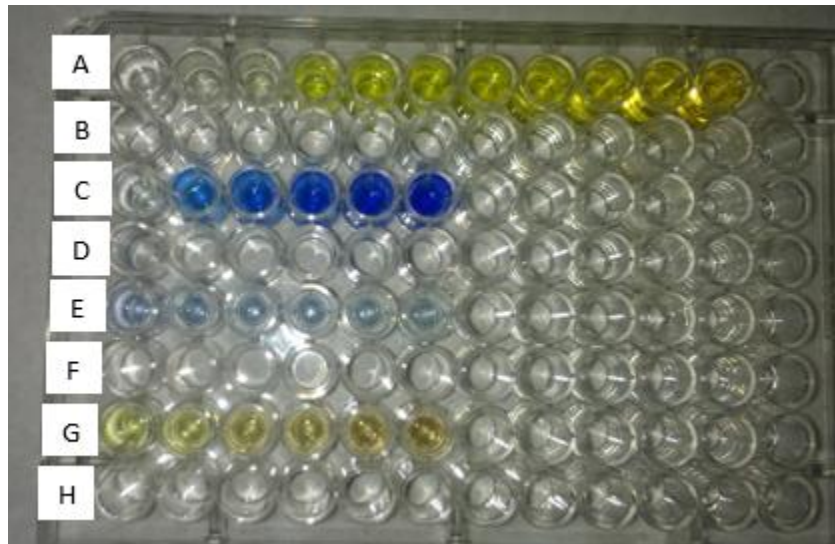
El reactivo de Karl Fischer es de un color café oscuro que se vuelve incoloro conforme va aumentando la cantidad de agua presente en la disolución y está constituido por  $I_2$ , una base, normalmente imidazol o piridina, y  $SO_2$  disueltos en un alcohol. En la figura 19 se muestra un ejemplo de reactivo de Karl Fischer donde el disolvente contiene dióxido de azufre e imidazol, que se disuelven en metanol y forma sulfuro de metilo de imidazolio (primera reacción). El agua de la muestra estudiada

reaccionará con yodo para dar metil sulfato de imidazolio y yoduro de imidazolium (segunda reacción) (Hădărugă, Hădărugă, & Isengard, 2013).



*Figura 19: Titulación de Karl Fischer en metanol, sulfuro de metilo e imidazol.*

En este ensayo se utilizó agua potable como analito y blanco. En un pozo se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de agua como blanco. En los siguientes diez pozos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  en cada uno de ellos y se agregaron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Karl Fischer en los diferentes pozos. Se tomaron las lecturas de estos pozos y se repitió todo el proceso anterior hasta tener 10 ensayos diferentes con once lecturas cada uno para apreciar reproducibilidad.

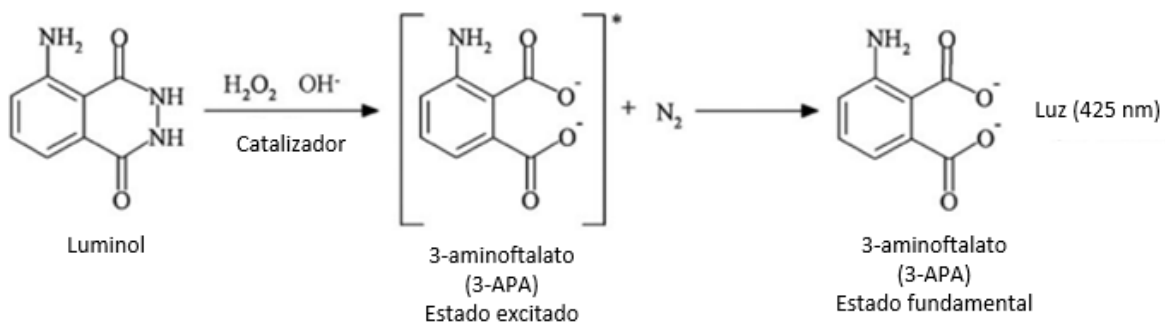


*Figura 20: Coloración obtenida por las disoluciones realizadas para los distintos ensayos colorimetricos; en la fila A las disoluciones de Karl-Fischer, en la fila C las disoluciones del complejo cobre amoniaco, en la fila E las disoluciones del reactivo de Biuret y en la fila G las disoluciones del reactivo de Drabkin.*

○ *3.1.4.5. Ensayos con la reacción de luminol con Hb.*

El luminol es un compuesto quimioluminiscente utilizado como prueba preliminar para la detección de sangre debido a su capacidad para detectar aún manchas de sangre ocultas debido al Hierro que contiene la sangre, además brinda la posibilidad de escanear áreas grandes. Los principales inconvenientes son la falta de especificidad, los resultados falsos positivos, y las condiciones del entorno oscuro. El mecanismo de

identificación se basa en la capacidad de la hemoglobina (Hb) y sus derivados de la sangre para mejorar la oxidación del luminol en presencia de una solución alcalina. El mecanismo químico subyacente, que fue controvertido durante muchos años (aún no se llega a una conclusión en esta fecha), se describe en la figura 21. En condiciones alcalinas, el luminol pierde 1 o 2 átomos de hidrógeno y sufre un proceso de oxidación (generalmente se utiliza peróxido de hidrógeno o perborato de sodio). El anillo que contiene nitrógeno del compuesto se abre, lo que resulta en una estructura excitada intermedia. La energía de este compuesto intermedio se libera como luz a 425 nm (Stoica et al., 2016).



*Figura 21: Reacción de emisión de luz por detección de sangre usando luminol.*

Debido a que la luz en estos ensayos se produce al mezclar dos disoluciones distintas, se modificó el montaje del equipo descrito anteriormente (Diseño del MIMC, página 24 y 25). Para disminuir en la medida de lo posible la interferencia de la luz ambiental se usaron tubos de PCR de 500  $\mu$ L, en lugar los pozos en la placa de microtitulación. Este

permite inclinarlos en un soporte y colocar una de las disoluciones en el tubo, para posteriormente inyectar la segunda de forma horizontal. Este arreglo posibilita que lo único que abre la carcasa del equipo es la delgada aguja de la jeringa que se usa para adicionar la segunda disolución. Adicionalmente se utiliza un teléfono celular y se coloca en un soporte para que se pueda videografiar la reacción, debido a que esta dura apenas unos segundos y no se puede seguir la lectura del multímetro a simple vista.

Se realizó una disolución stock de Hb pesando 0.2g de Hb en 10 mL de agua. De la disolución stock se tomaron 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{L}$  y se colocaron en diferentes tubos de PCR a los cuales se agregó una disolución que contenía 0.002g de luminol, 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M y 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para finalmente llevar a cada pozo a un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  con agua potable.

La luz se produce a partir de la mezcla de las dos disoluciones, la que contiene luminol con el catalizador y la que contiene el agente oxidante. En este caso, con una jeringa de insulina se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno al 3% a cada una de las disoluciones de los pozos anteriormente descritas. Para detectar resultados experimentales se videografiaron 5 ensayos que corresponden a cada mezcla de disoluciones con diferentes concentraciones de luminol (figura 22).



Figura 22: Imágenes de la producción de luz al inyectar peróxido de hidrógeno a la disolución con luminol, Hb, NaOH y NH<sub>4</sub>OH.

- 3.1.5. Resultados de los ensayos microfotocolorimétricos.
  - 3.1.5.1. Resultados de los ensayos con el complejo cobre amoniacado.

A continuación, se plantea el cálculo de la concentración de las disoluciones anteriormente descritas para los ensayos con el complejo cobre amoniacado:

Disolución stock:

$$\text{Concentración de } (Cu(NO_3)_2) = \left( \frac{18.4 \text{ mg de } Cu(NO_3)_2 \text{ pesado}}{1 \text{ mL de agua}} \right)$$

$$\left( \frac{1 \text{ mmol}}{187.56 \text{ mg de } Cu(NO_3)_2} \right) = \left( \frac{0.0981 \text{ mmol}}{1 \text{ mL de agua}} \right) \rightarrow \left( \frac{0.0981 \text{ mol}}{1 \text{ L de agua}} \right) \dots\dots\dots \text{Ecuación 5}$$

Disoluciones empleadas para la curva patrón:

A partir de la siguiente ecuación se calcularon las concentraciones en cada una de las disoluciones de los ensayos:

$$([i] \textit{ inicial})(\textit{volumen inicial}) = ([i] \textit{ final})(\textit{volumen final}) \dots\dots\textbf{Ecuación 6}$$

Reacomodando la ecuación 1:

$$([i] \textit{ final}) = \frac{(\textit{volumen inicial})}{(\textit{volumen final})} ([i] \textit{ inicial}) \dots\dots\dots\textbf{Ecuación 7}$$

Sustituyendo para este caso:

$$[\textit{Cu(NO3)2}] \textit{ usada} = \frac{(\textit{Volumen tomado del stock})}{(\textit{Volumen final})} ([\textit{Cu(2NO3)2}] \textit{ stock}) \dots\dots\textbf{Ecuación 8}$$

Siendo:

$$\textbf{Factor de dilución} = \frac{(\textit{Volumen tomado del stock})}{(\textit{Volumen final})} \dots\dots\dots\textbf{Ecuación 9}$$

Sustituyendo los datos de las diluciones en la ecuación 8 se obtuvieron los valores de la tabla 2.

*Tabla 2. Concentración de las disoluciones empleadas en los ensayos del complejo cobre amoniac.*

Número de disolución	Factor de dilución	Concentración (mol L <sup>-1</sup> )	Concentración (mol Kg <sup>-1</sup> )
Blanco	0	0	0
1	0.0667	0.0654	0.0758
2	0.1333	0.1308	0.1515
3	0.2000	0.1962	0.2273
4	0.2667	0.2616	0.3030
5	0.3333	0.3270	0.3788

Para obtener la A a partir de los datos de resistencia lumínica tomados del multímetro se utilizó la siguiente ecuación:

$$A = -\log \left( \frac{\text{Lectura de la muestra} - \text{Lectura de la luz residual}}{\text{Lectura del blanco} - \text{Lectura de la luz residual}} \right) = -\log \left( \frac{R_i - R_r}{R_0 - R_r} \right) \text{Ecuación 10}$$

Donde:

$R_i$ : lectura de la muestra

$R_r$ : lectura residual

$R_0$ : lectura del blanco

En la tabla 3 y 4 se reportan los datos obtenidos, así como los valores de absorbancia determinados a partir de la ecuación 10 de los diferentes ensayos.



Tabla 3. Datos de resistencia lumínica obtenidos a partir de los ensayos realizados para las disoluciones preparadas del complejo cobre amoniaco.

*Resistencia lumínica en los ensayos de las disoluciones de cobre amoniaco (mOhms)*

<i>Número de disolución</i>	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
<i>Rr</i>	553	262	306	573	573	573	573	573	573	573
<i>Blanco</i>	24	25	14	20	20	20	22	21	28	26
<i>1</i>	27	29	16	26	25	25	26	27	35	29
<i>2</i>	31	33	18	32	28	31	33	35	38	36
<i>3</i>	37	35	21	36	34	36	38	39	42	40
<i>4</i>	40	39	23	44	37	42	44	46	48	45
<i>5</i>	44	43	25	47	41	46	50	51	52	49

Tabla 4. *Datos de absorbancia calculados a partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados para las disoluciones preparadas del complejo cobre amoniaco.*

*Absorbancias calculadas para los ensayos de las disoluciones de cobre amoniaco*

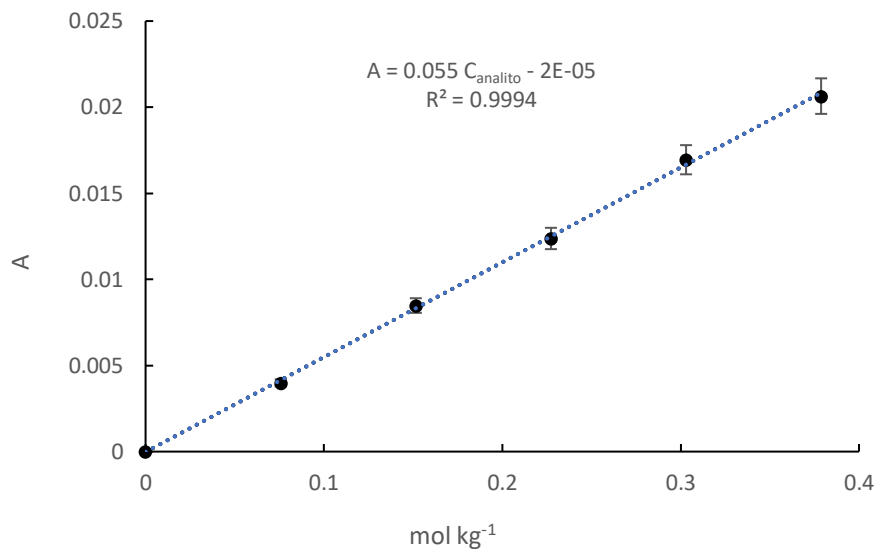
<i>Número de disolución Blanco</i>	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.0025	0.0074	0.0030	0.0047	0.0039	0.0039	0.0032	0.0047	0.0056	0.0024
2	0.0058	0.0149	0.0060	0.0095	0.0063	0.0087	0.0088	0.0112	0.0080	0.0080
3	0.0108	0.0187	0.0105	0.0128	0.0111	0.0128	0.0128	0.0144	0.0113	0.0113
4	0.0133	0.0264	0.0136	0.0193	0.0136	0.0176	0.0177	0.0201	0.0162	0.0154
5	0.0167	0.0343	0.0167	0.0217	0.0168	0.0209	0.0226	0.0243	0.0196	0.0187

Las gráficas de la 1 a la 10, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos utilizando las disoluciones de cobre amoniaco.

A partir de los datos obtenidos de los ensayos se realizó un promedio de las lecturas registradas, se reportan los valores de A determinados con la ecuación 10 (tabla 5) así como su representación gráfica (gráfica 11).

*Tabla 5. Absorbancia promedio calculada a partir de las lecturas de los ensayos del complejo cobre amoniaco.*

<i>Número de disolución</i>	<i>Concentración (mol Kg<sup>-1</sup>)</i>	<i>Lectura promedio de resistencia lumínica (mOhms)</i>	<i>A</i>
<i>Rr</i>	0	513.2	0
<i>Blanco</i>	0	22	0
<i>1</i>	0.0758	26.5	0.0040
<i>2</i>	0.1515	31.5	0.0085
<i>3</i>	0.2273	35.8	0.0124
<i>4</i>	0.3030	40.8	0.0169
<i>5</i>	0.3788	44.8	0.0206



*Gráfica 11: Curva de calibración obtenida a partir de la absorbancia del promedio de los ensayos realizados de todas las disoluciones con el complejo cobre-amoniaco.*

En los ensayos de la disolución cobre-amoniaco, la diferencia de concentración en cada disolución es claramente visible por la intensidad de coloración en cada una, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. La gráfica anterior muestra el promedio de las absorbancias obtenidas en función de la concentración de las disoluciones y cómo se puede observar, los resultados son perfectamente representados por un modelo de línea recta, lo que sugiere que el material de la placa y la reflexión de la luz por los pozos adyacentes al pozo de análisis no son significativos en el análisis de los estándares.

○ 3.1.5.2. Resultados de los ensayos usando el reactivo de Biuret.

Resultados de los ensayos usando el reactivo de Biuret:

Debido a la preparación de la solución stock de albumina de huevo, la concentración de las disoluciones para los ensayos depende de la dilución dada por la ecuación 10, como se muestra en la tabla 6. En este caso  $R_r$  es 309 (mOhms) para todos los ensayos.

*Tabla 6. Concentración de las disoluciones utilizadas en los ensayos con el reactivo de Biuret.*

<i>Número de disolución</i>	<i>Factor de disolución</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Concentración (mol/kg<sup>-1</sup>)</i>
<i>Blanco</i>	0	0	0
1	0.0667	0.0667	1.5459 x10 <sup>-6</sup>
2	0.1333	0.1333	3.0917 x10 <sup>-6</sup>
3	0.2000	0.2000	4.6376 x10 <sup>-6</sup>
4	0.2667	0.2667	6.1834 x10 <sup>-6</sup>
5	0.3333	0.3333	7.7293 x10 <sup>-6</sup>

A continuación, se muestran los datos obtenidos en estos ensayos.

Tabla 7. Datos de resistencia lumínica obtenidos para las curvas de calibración a partir de los ensayos realizados en las disoluciones preparadas con el reactivo de Biuret.

*Resistencia lumínica en los ensayos de las disoluciones con el reactivo de Biuret (mOhms)*

<i>Número de disolución</i>	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
<i>Blanco</i>	105	117	118	125	129	121	127	116	116	121
1	112	127	127	135	132	128	132	125	129	127
2	125	138	134	140	137	135	138	136	138	136
3	137	148	143	146	141	140	143	145	146	144
4	148	156	148	152	147	148	148	154	154	153
5	157	165	155	160	151	156	155	160	161	160

Tabla 8. Absorbancias calculadas para las curvas de calibración a partir de los ensayos realizados en las disoluciones preparadas con el reactivo de Biuret.

*Absorbancias calculadas para los ensayos de las disoluciones con el reactiva de Biuret*

<i>Número de disolución Blanco</i>	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.0152	0.0232	0.0210	0.0243	0.0073	0.0165	0.0121	0.0207	0.0303	0.0141
2	0.0448	0.0503	0.0380	0.0369	0.0197	0.0336	0.0271	0.0475	0.0526	0.0361
3	0.0741	0.0765	0.0609	0.0526	0.0300	0.0463	0.0400	0.0707	0.0734	0.0567
4	0.1028	0.0986	0.0742	0.0689	0.0458	0.0673	0.0532	0.0952	0.0952	0.0810
5	0.1278	0.1249	0.0935	0.0916	0.0566	0.0895	0.0726	0.1124	0.1153	0.1010

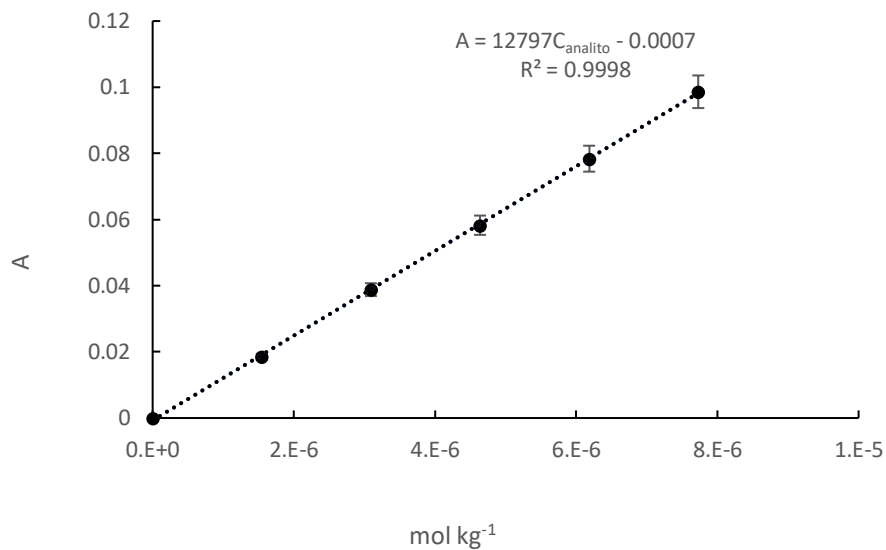
Las gráficas de la 12 a la 21, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos utilizando el reactivo de Biuret.

Nuevamente se realizó el promedio de las lecturas y se obtuvieron los siguientes resultados:

*Tabla 9. Absorbancia calculada a partir del promedio de las lecturas de resistencia luminica con los ensayos del reactivo de Biuret.*

<i>Número de disolución</i>	<i>Concentración (mol/kg<sup>-1</sup>)</i>	<i>Lectura promedio de resistencia lumínica (mOhms)</i>	<i>A</i>
<i>Blanco</i>	0	119.5	0
1	1.5459 x10 <sup>-6</sup>	127.4	0.0185
2	3.0917 x10 <sup>-6</sup>	135.7	0.0388
3	4.6376 x10 <sup>-6</sup>	143.3	0.0583
4	6.1834 x10 <sup>-6</sup>	150.8	0.0784
5	7.7293 x10 <sup>-6</sup>	158	0.0986





*Gráfico 22: Curva de calibración obtenida a partir del promedio de los diez ensayos realizados para las disoluciones del reactivo de Biuret.*

Para el ensayo con el reactivo de Biuret la diferencia de tonalidades visualmente fue poca ya que la intensidad de color debido a la concentración resultó ser tenue. Sin embargo, se trabajó con este intervalo de concentraciones debido a que el equipo mostraba diferencias de concentraciones de albumina de huevo sin problema alguno.

○ *3.1.5.3. Resultados de los ensayos usando el reactivo de Drabkin.*

La concentración de la disolución stock preparada del reactivo de Drabkin en agua es de 1 mg/mL, por tanto, la concentración en las disoluciones

utilizadas para los ensayos depende de la dilución utilizada y que se puede calcular con la ecuación 9.

*Tabla 10. Concentración de las disoluciones utilizadas en los ensayos con el reactivo de Drabkin.*

<i>Número de disolución</i>	<i>Factor de disolución</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>
<i>Blanco</i>	0	0
1	0.1667	0.1667
2	0.3333	0.3333
3	0.5000	0.5000
4	0.6667	0.6667
5	0.8333	0.8333

A continuación, se muestran los datos (tabla 11 y tabla 12) obtenidos en los ensayos realizados con un valor de  $R_r = 257$  (mOhms).

Tabla 11. Datos de resistencia lumínica obtenidos en los ensayos realizados a las disoluciones preparadas con el reactivo de Drabkin.

*Resistencia lumínica en los ensayos de las disoluciones con el reactivo de Drabkin (mOhms)*

<i>Número de disolución</i>	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
<i>Blanco</i>	104	54	53	48	54	56	49	64	61	54
<i>1</i>	135	92	93	93	63	71	77	79	74	76
<i>2</i>	152	106	108	108	69	81	90	90	85	86
<i>3</i>	176	135	134	137	77	92	106	102	96	99
<i>4</i>	196	152	156	157	84	100	121	113	111	113
<i>5</i>	215	167	170	172	93	109	134	122	124	124

*Tabla 12. Absorbancias calculadas para las curvas de calibración de los ensayos realizados a las disoluciones preparadas con el reactivo de Drabkin.*

*Absorbancias calculadas para los ensayos de las disoluciones con el reactivo de Drabkin*

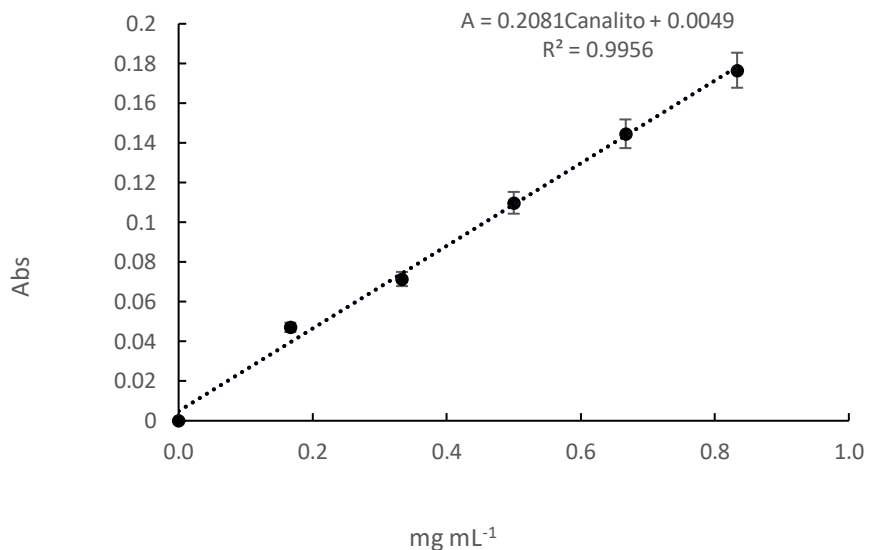
<i>Número de disolución</i>	<i>Primer ensayo</i>	<i>Segundo ensayo</i>	<i>Tercer ensayo</i>	<i>Cuarto ensayo</i>	<i>Quinto ensayo</i>	<i>Sexto ensayo</i>	<i>Séptimo ensayo</i>	<i>Octavo ensayo</i>	<i>Noveno ensayo</i>	<i>Decimo ensayo</i>
<i>Blanco</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.0712	0.0701	0.0738	0.0822	0.0156	0.0265	0.0495	0.0274	0.0234	0.0392
2	0.1159	0.0990	0.1050	0.1134	0.0263	0.0452	0.0745	0.0487	0.0442	0.0582
3	0.1879	0.1660	0.1652	0.1811	0.0411	0.0667	0.1075	0.0732	0.0661	0.0843
4	0.2587	0.2106	0.2235	0.2348	0.0544	0.0830	0.1408	0.0969	0.0978	0.1143
5	0.3386	0.2543	0.2652	0.2799	0.0721	0.1021	0.1719	0.1173	0.1273	0.1394

Las gráficas de la 23 a la 32, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos utilizando el reactivo de Drabkin.

El cálculo del promedio de las lecturas tomadas en los ensayos con el reactivo de Drabkin, el cálculo de la A y su representación gráfica se muestran a continuación:

*Tabla 13. Absorbancia promedio de las lecturas con los ensayos del reactivo de Drabkin.*

<i>Número de disolución</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Lectura promedio de resistencia lumínica (mOhms)</i>	<i>A</i>
<i>Blanco</i>	0	59.7	0
<i>1</i>	0.1667	85.3	0.0471
<i>2</i>	0.3333	97.5	0.0714
<i>3</i>	0.5000	115.4	0.1098
<i>4</i>	0.6667	130.3	0.1446
<i>5</i>	0.8333	143	0.1766



*Graficó 33: Absorbancia promedio de los diez ensayos realizados a las disoluciones de las curvas de calibración del reactivo de Drabkin.*

Los ensayos con el reactivo de Drabkin presentaron una coloración roja clara cuya intensidad varía ligeramente debido a la concentración de cada disolución y esto concuerda con los datos obtenidos. Las absorbancias mostradas en la anterior gráfica muestran que el coeficiente de correlación es cercano a uno y, por tanto, verificar que los resultados presentan una tendencia lineal.

- 3.1.5.4. Resultados de los ensayos usando el reactivo de Karl-Fischer.

Las curvas de calibración hechas con el reactivo de Karl-Fischer pasan de disoluciones sin coloración hasta las que tienen una coloración bastante notable, por tanto, la diferencia entre las absorbancias registradas entre las primeras disoluciones (las primera 5 disoluciones) y su relación con las últimas disoluciones (las ultimas 5 disoluciones) es difícil de apreciar en un gráfico, por lo que para este caso se introdujo un factor de corrección de volumen a los valores de las absorbancias para una mejor visualización. La ecuación 11 muestra el factor de corrección en tanto la ecuación 12, el cálculo de absorbancia corregida.

$$\text{Factor de corrección} = \frac{\text{Volumen inicial} + \text{Volumen añadido de Karl-Fischer}}{\text{Volumen inicial}} \text{.Ecuación 11}$$

$$\text{Absorbancia corregida} = (\text{Abs}) (\text{Factor de corrección}) \text{ .....Ecuación 12}$$

Con las anteriores ecuaciones se construyeron las tabla 14 y 15 que muestran los resultados de los ensayos realizados con un valor de  $R_r = 149$  (mOhms).

*Tabla 14.* Datos de resistencia lumínica obtenidos en los ensayos realizados a las disoluciones preparadas con el reactivo de Karl-Fischer.

*Resistencia lumínica en los ensayos de las disoluciones con el reactivo de Karl-Fisher (mOhms)*

<i>Volumen usado de reactivo Karl-Fischer (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
0	39.1	39.1	53.1	39.1	39.1	39.1	53.1	53.1	33	.
20	59.1	58.6	63.9	62	50.6	47.4	62.7	55	41.4	59.8
40	60.4	59.4	61.2	57.6	52.2	49.3	59.6	62.4	49	58.1
60	62.7	64.1	75.4	70.6	58.3	50.2	62.9	60.3	47.1	61.1
80	59.2	60	70.9	68.9	61.3	50.7	66.4	65.3	52.7	66.8
100	62.7	63.2	73.6	62.5	62.8	56.9	65	65.6	56.5	68
120	73	81.2	88	79.3	76.8	66.9	73.1	75	65.9	74.9
140	88.7	86.5	100.9	87.9	88.1	75	77.6	77.1	72.3	80.5
160	90.7	99.5	114.8	107.8	97.7	81.8	80.5	79.6	74.6	85.9
180	95.5	101.2	117.1	112.2	99.4	89	81.7	82.4	79.6	86.3
200	98.7	103.6	122.3	118.9	104.3	96	85.6	85.2	85.6	88.9



Tabla 15. Absorbancia corregida para la valoración de H<sub>2</sub>O con el reactivo de Karl-Fischer.

*Absorbancias calculadas para los ensayos de las disoluciones con el reactivo de Karl-Fisher*

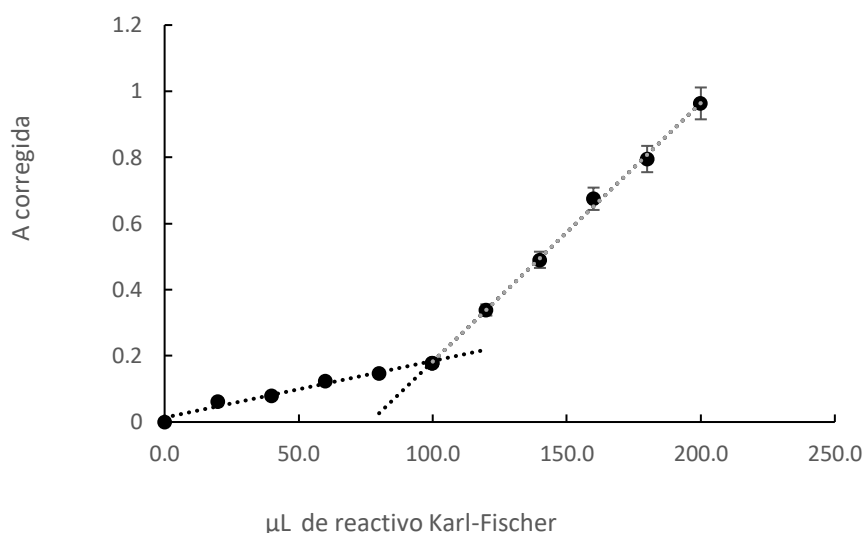
Volumen usado de reactivo Karl-Fischer ( $\mu\text{L}$ )	Factor de corrección	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo	Octavo ensayo	Noveno ensayo	Decimo ensayo
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1.2	0.1047	0.1018	0.1333	0.1218	0.0576	0.0409	0.0550	0.0104	0.0392	0.0377
40	1.4	0.1310	0.1242	0.1365	0.1121	0.0772	0.0592	0.0427	0.0620	0.0902	0.0326
60	1.6	0.1680	0.1793	0.2786	0.2347	0.1334	0.0740	0.0749	0.0542	0.0901	0.0605
80	1.8	0.1579	0.1649	0.2670	0.2473	0.1764	0.0872	0.1167	0.1064	0.1455	0.1205
100	2	0.2100	0.2150	0.3273	0.2080	0.2110	0.1535	0.1151	0.1213	0.1966	0.1467
120	2.2	0.3524	0.4615	0.5625	0.4351	0.4014	0.2786	0.2235	0.2477	0.3187	0.2464
140	2.4	0.6256	0.5883	0.8612	0.6119	0.6153	0.4122	0.3075	0.3002	0.4312	0.3507
160	2.6	0.7159	0.9006	1.3181	1.1079	0.8603	0.5554	0.3799	0.3652	0.5015	0.4727
180	2.8	0.8754	1.0124	1.5042	1.3304	0.9674	0.7360	0.4306	0.4434	0.6247	0.5167
200	3	1.0183	1.1518	1.8435	1.6873	1.1721	0.9502	0.5392	0.5310	0.7871	0.6088

Con los datos de volumen del reactivo de Karl-Fischer y la absorbancia corregida se realizó la gráfica para cada ensayo mostrando dos líneas de tendencias por gráfica. Las gráficas de la 34 a la 43, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos utilizando el reactivo de Karl-Fisher.

El cálculo del promedio de las lecturas tomadas en los ensayos con el reactivo de Karl-Fischer, el cálculo de la A corregida y su representación gráfica se muestran a continuación:

*Tabla 16. Absorbancias corregidas calculadas del promedio de las lecturas con los ensayos del reactivo de Karl-Fischer.*

<i>Volumen usado de reactivo Karl-Fischer (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>Factor de corrección</i>	<i>Lectura promedio (mOhms)</i>	<i>A corregida promedio</i>
0	1	44.09	0
20	1.2	56.05	0.0631
40	1.4	56.92	0.0793
60	1.6	61.27	0.1243
80	1.8	62.22	0.1483
100	2	63.68	0.1795
120	2.2	75.41	0.3388
140	2.4	83.46	0.4903
160	2.6	91.29	0.6749
180	2.8	94.44	0.7950
200	3	98.91	0.9632



*Gráfico 43: Curva de calibración de H<sub>2</sub>O con el reactivo de Karl-Fischer a partir del promedio de las resistencias de los diez ensayos realizados.*

En el ensayo con el reactivo de Karl-Fischer se puede apreciar fácilmente una coloración amarillenta que se va oscureciendo hasta tener un tono café oscuro conforme se va concentrando la disolución. Se puede observar que una coloración predominantemente amarilla clara en las primeras disoluciones mientras que para las últimas se observa una coloración predominantemente café. En el gráfico 43 se pueden ver dos tendencias distintas, la primera debido a la coloración clara que presenta el reactivo al estar antes del punto de equivalencia y la segunda, cuando la coloración es oscura y se ha sobrepasado el punto de equivalencia. Estas tendencias se interceptan en el punto donde se ha utilizado un volumen de reactivo de Karl Fischer igual al volumen de analito en el medio, en este caso 100 µL, que equivale al punto final de la valoración.

○ 3.1.5.5. Resultados de los ensayos usando Luminol.

La reacción con luminol dura unos pocos segundos y presenta una luz azul obscuro. En este caso se registraron los datos obtenidos con un multímetro, mediante una grabación para relacionar los máximos valores con la concentración de Hb en la disolución. A continuación, se muestran los datos obtenidos (tabla 17).

*Tabla 17. Potencial registrado por segundo para cada ensayo usando luminol.*

<i>Tiempo (s)</i>	<i>Lecturas (mV)</i>				
	<i>Ensayo 1</i>	<i>Ensayo 2</i>	<i>Ensayo 3</i>	<i>Ensayo 4</i>	<i>Ensayo 5</i>
1	0	0	0	0	0
2	0.065	3.98	0.038	5.79	8.8
3	11.56	12.66	13.42	14.05	14.88
4	6.76	7.29	5.75	2.63	3.36
5	5.27	3.34	4	1.24	1.18
6	4.52	2.06	3.04	0.75	0.56
7	3.54	1.26	2.46	0.49	0.3
8	2.76	0.059	1.76	0.36	0.18
9	1.65	0.037	1.18	0.23	0.09
10	1.24	0.025	0.8	0.2	0.07

Las gráficas de la 44 a la 48, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos utilizando luminol.

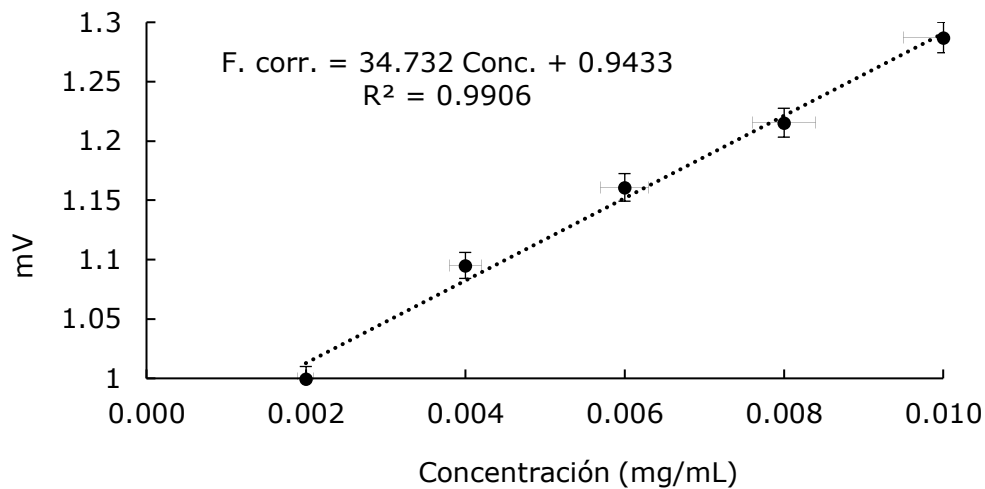
Para relacionar de manera lineal los puntos de máximo potencial se introdujo un factor de correlación definido como:

$$\text{Factor de correlación} = \frac{\text{Punto máximo del ensayo } x}{\text{Punto máximo del primer ensayo}} \dots\dots\dots\text{Ecuación 13}$$

Con la ecuación 13 se obtuvieron los datos de la relación entre los ensayos realizados con luminol y su representación gráficos como se muestra a continuación:

Tabla 18. Potencial máximo registrado y factor de correlación para cada ensayo usando 0.002 g de luminol.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración de Hb (mg/mL)</i>	<i>Punto máximo</i>	<i>Factor de correlación</i>
1	0.002	11.56	1
2	0.004	12.66	1.0952
3	0.006	13.42	1.1609
4	0.008	14.05	1.2154
5	0.01	14.88	1.2872



*Gráfico 49: Factor de correlación en función de la concentración realizados con luminol*

Con esta gráfica se puede apreciar como la máxima intensidad luminosa detectada está relacionada la concentración de Hb en cada ensayo por un comportamiento lineal.

- *3.1.6. Conclusiones parciales.*

Utilizando materiales de bajo costo y de adquisición local se ha podido crear un prototipo de fotocolorímetro con el que se trazaron curvas de calibración típicas para las disoluciones de complejo  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_3)_2$ , reactivo de Biuret con albumina de huevo, reactivo de Drabkin con hemoglobina humana, reactivo de Karl-Fisher con agua y luminol con

hemoglobina humana dando coeficientes de correlación satisfactorios para cada caso.

Para las curvas de calibración realizadas se agregaron barras de error del 5 %, las cuales apenas se observan en cualquiera de las curvas, lo que indica que la variación de los datos usados no es muy grande y, por tanto, es confiable en cuanto su repetibilidad.

Los experimentos se realizaron usando un volumen máximo de 300  $\mu\text{L}$ , pero tanto la coloración como el volumen de las disoluciones pueden ser apreciados con facilidad desde los 20  $\mu\text{L}$  por el uso de los pozos de la microplaca de titulación.

La lectura en serie de las disoluciones ya preparadas en la microplaca de titulación permitió una mayor velocidad de lectura de los diferentes ensayos al solo desplazar la microplaca de titulación sobre el acrílico para enfocarla sobre la luz del LED, sin que esto afectara de manera apreciable la lectura por dispersión de la luz con las disoluciones depositadas en los otros pozos.

## 3.2. Curvas de calibración voltamperométricas.

- 3.2.1. *Objetivos particulares*

Comprobar el funcionamiento de los equipos utilizados (MIMP (micro polarógrafo de mínima instrumentación) y potenciostato BAS CV-27) y la celda de microtitulación acoplada por medio de reacciones redox.

Observar el comportamiento electroquímico de las especies redox yoduro/triyoduro, ferricianuro de potasio y sulfato de cobre.

- 3.2.2. *Hipótesis particular*

Las técnicas voltamperométricas permiten obtener las curvas de intensidad de corriente en función del potencial (curvas  $i$ - $E$ ). El micro escalamiento de estas técnicas ya ha tenido éxito en varios casos, (Baeza reyes & García Mendoza, 2011), (Dauer y Santillán Martínez, 2011), etc. En este trabajo podrán observar las curvas voltamperométricas corriente-potencial aplicando perturbaciones de potencial con un sistema de tres electrodos adaptado para trabajar en pozos de microtitulación con un volumen máximo de 300  $\mu$ L.



- 3.2.3. *Materiales*

- Nitrato de potasio, Aldrich chemical company Inc., Lote 01414JF,  $\text{KNO}_3$  101.11 g mol<sup>-1</sup>
- Yoduro de potasio, MERK, Lote 411603 N, KI 99.5%
- Hidróxido de sodio (lentejas), R.A., Productos químicos monterrey, Lote 002007, NaOH 40 g mol<sup>-1</sup>
- Sulfato cúprico, R.A., Productos químicos monterrey, Lote 001327,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  245.66 g mol<sup>-1</sup>
- Ácido sulfúrico, R.A., Karal, Lote 24989,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98.08 g mol<sup>-1</sup>
- Ferrocianuro de potasio, R.A., Productos químicos monterrey, Lote 001327  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  422.39 g mol<sup>-1</sup>
- Puntas de micropipeta automática
- Alambre de plata 1.0 mm de diámetro
- Alambre de acero inoxidable 1.0 mm de diámetro
- Alambre de platino 1.0 mm de diámetro
- Alambre de cobre convencional de grosor 3 mm
- Agua potable para realizar disoluciones y lavados pertinentes

- Jeringa plástica de insulina de 1.0 mL
  - Placa de microtitulación de poliestireno fondo plano con 96 pozos, PF 1003-F
  - Multímetro Steren Mul-010
  - Potenciostato BAS (Bioanalytical Systems) CV-27 Voltammograph
  - Cables con pinzas caimán
  - Cables con pinza caimán y pin plátano
  - Jacks tipo banana
  - Brazo de plástico articulado
  - Cinta de aislar modelo PI-13 NE
- 
- *3.2.4. Comprobación de funcionamiento de los equipos MIMP y potenciostato*

El funcionamiento de ambos equipos será adecuado siempre que el circuito eléctrico en el sistema se comporte de acuerdo con la ley de Ohm,

esto quiere decir que la diferencia de potencial suministrada por los equipos y que circula por un conductor determinado tiene que comportarse de manera lineal a la cantidad de la corriente registrada y ser proporcional a la resistencia del sistema. Para comprobar el correcto funcionamiento del equipo MIMP (micro polarógrafo de mínima instrumentación) se puede crear un sistema sencillo en donde la resistencia del sistema sea simulada.

En este caso se contó con una celda ficticia, en la que una serie de resistencias eléctricas conectadas a Jacks simulan ser un medio de trabajo al conectarla al equipo, como se muestra en la siguiente imagen:



*Figura 20: Celda ficticia*

*→: Electrodo de referencia.*

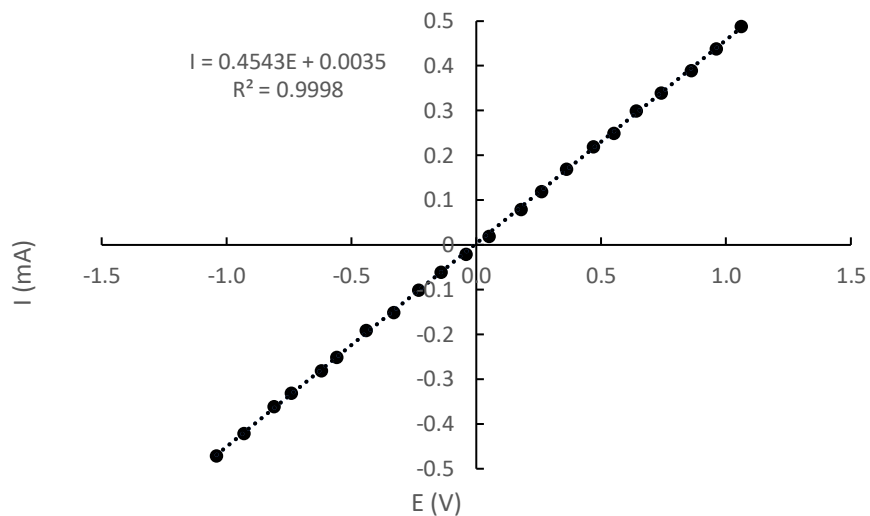
*τ: Electrodo Auxiliar.*

*●: Electrodo de trabajo.*

Se conectó la celda ficticia al MIMP y se registró la intensidad de corriente en un intervalo de  $-1.1\text{ V}$  a  $1.1\text{ V}$  para demostrar la linealidad de la corriente y el potencial durante el barrido y se obtuvieron los siguientes resultados:

*Tabla 19. Datos registrados durante el barrido de potencial de  $-1.1\text{ V}$  a  $1.1\text{ V}$  para la celda ficticia con el MIMP.*

$E(V)$	$I(mA)$	$E(V)$	$I(mA)$
0.05	0.02	-0.04	-0.02
0.18	0.08	-0.14	-0.06
0.26	0.12	-0.23	-0.1
0.36	0.17	-0.33	-0.15
0.47	0.22	-0.44	-0.19
0.55	0.25	-0.56	-0.25
0.64	0.3	-0.62	-0.28
0.74	0.34	-0.74	-0.33
0.86	0.39	-0.81	-0.36
0.96	0.44	-0.93	-0.42
1.06	0.49	-1.04	-0.47



*Gráfico 50: Corriente (mA) en función del potencial aplicado (V) para la celda ficticia.*

En el gráfico 50 se muestra la corriente registrada por los equipos, MIMP y potenciostato BAS, en un intervalo de potencial de  $-1.1$  a  $1.1$  V. El comportamiento observado entre la corriente y el potencial es lineal, lo que quiere decir que la diferencia de potencial es proporcional a la corriente que circula a lo largo del conductor utilizado y cuyo factor de proporcionalidad está definida por la resistividad, área y longitud de la serie de resistencias utilizadas en la celda ficticia, que es lo que se esperaba obtener.

Este procedimiento se repitió conectando el potenciostato BAS a la celda ficticia, pero se omiten los datos obtenidos ya que presentan la misma tendencia lineal y valores muy similares en la corriente registrada, obteniéndose así resultados iguales.

- *3.2.5. Resultados utilizando MIMP.*

Se trazaron los voltamperogramas en el sistema acoplado con MIMP, utilizando 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$  0.1 F como medio de reacción y diferentes concentraciones de  $\text{I}_2/\text{KI}$ .

- *3.2.5.1. Análisis para el medio de reacción.*

El análisis se puede ver afectado por los efectos de migración y resistencia eléctrica. Para minimizar estos efectos se utiliza un electrolito soporte que no modifique el E del par redox, en este caso se utiliza  $\text{KNO}_3$ , ya que en caso de no utilizarlo la exactitud y precisión de los resultados se puede ver reducida.

A continuación, se presenta la respuesta del electrolito soporte para diferentes potenciales en el sistema (tabla 20, gráfico 51).

Tabla 20. Datos registrados en el barrido de potencial para 100  $\mu\text{L}$  del electrolito soporte  $\text{KNO}_3$  0.1 M (ET: barra de grafito, ER: Barra de acero inoxidable y EA: Barra de acero inoxidable).

Orden de los datos	E(V)	I(mA)	Orden de los datos	E(V)	I(mA)
1	-1.09	-1.94	13	0.21	0.01
2	-1.05	-1.63	14	0.31	0.02
3	-0.83	-0.93	15	0.4	0.03
4	-0.74	-0.52	16	0.52	0.05
5	-0.67	-0.27	17	0.7	0.09
6	-0.57	-0.11	18	0.87	0.16
7	-0.46	-0.04	19	0.97	0.2
8	-0.35	-0.01	20	1.07	0.31
9	-0.28	0	21	1.2	0.49
10	-0.24	0.01	22	1.34	0.75
11	0.11	0	23	1.47	1.25
12	0.16	0	24	1.71	1.93

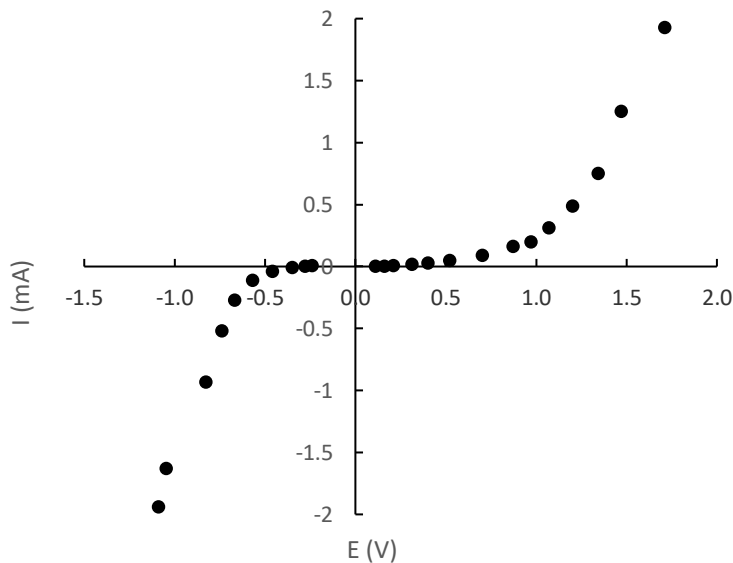


Gráfico 51: Barrido de potencial en 100  $\mu\text{L}$  0.1 F de  $\text{KNO}_3$  (Tiempo de muestreo: 10 s, ET: barra de grafito, ER: Barra de acero inoxidable y EA: Barra de acero inoxidable).

Se puede observar que la respuesta del sistema para el potencial inducido tiene el comportamiento sinusoidal típico de un dominio de electroactividad de una voltamperometría de barrido lineal.

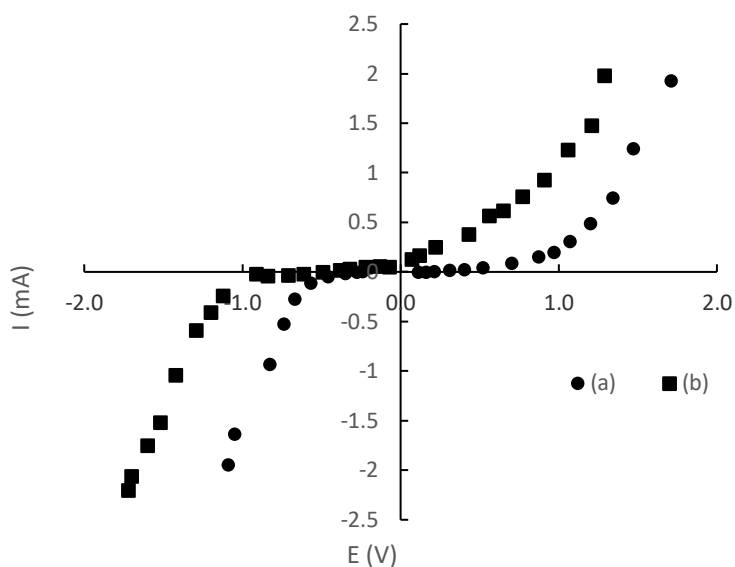
○ 3.2.5.2. *Análisis de 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{I}_2/\text{KI}$  0.1 F en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$ :*

Para comprobar que el sistema funciona adecuadamente se comparan los voltamperogramas obtenidos del medio de reacción puro y del medio de reacción con el analito ( $\text{I}_2/\text{KI}$  0.1 F).

*Tabla 21. Datos de E/i registrados durante el barrido de potencial en 100  $\mu\text{L}$  del electrolito soporte  $\text{KNO}_3$  0.1 M con adición de 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{I}_2/\text{KI}$  0.1 F.*

<i>Orden de los datos</i>	<i>E(V)</i>	<i>I(mA)</i>	<i>Orden de los datos</i>	<i>E(V)</i>	<i>I(mA)</i>
1	-1.72	-2.2	16	-0.22	0.05
2	-1.7	-2.06	17	-0.13	0.06
3	-1.6	-1.75	18	-0.07	0.05
4	-1.52	-1.52	19	0.07	0.13
5	-1.42	-1.04	20	0.12	0.17
6	-1.29	-0.59	21	0.22	0.25
7	-1.2	-0.41	22	0.43	0.38
8	-1.12	-0.24	23	0.56	0.57
9	-0.91	-0.02	24	0.65	0.62
10	-0.84	-0.04	25	0.77	0.76
11	-0.71	-0.03	26	0.91	0.93
12	-0.61	-0.02	27	1.06	1.23
13	-0.49	0	28	1.21	1.48
14	-0.38	0.02	29	1.29	1.98
15	-0.32	0.03			





*Gráfica 52: Comparación entre los voltamperogramas obtenidos con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$  0.1 M en ausencia (a) y presencia de  $\text{I}_3$  (20  $\mu\text{L}$ ).*

El desplazamiento entre estos los voltamperogramas demuestra distintos sistemas por tanto el equipo detecta adecuadamente el analito.

- 3.2.5.3. Análisis de 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{I}_2/\text{KI}$  0.1 F en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$  por voltamperometría cíclica.

En este experimento se realizaron dos voltamperogramas cíclicos, haciendo uno con un barrido anódico y otro con un barrido catódico. Con esto se pretende observar si existe diferencia y de existir entonces definir

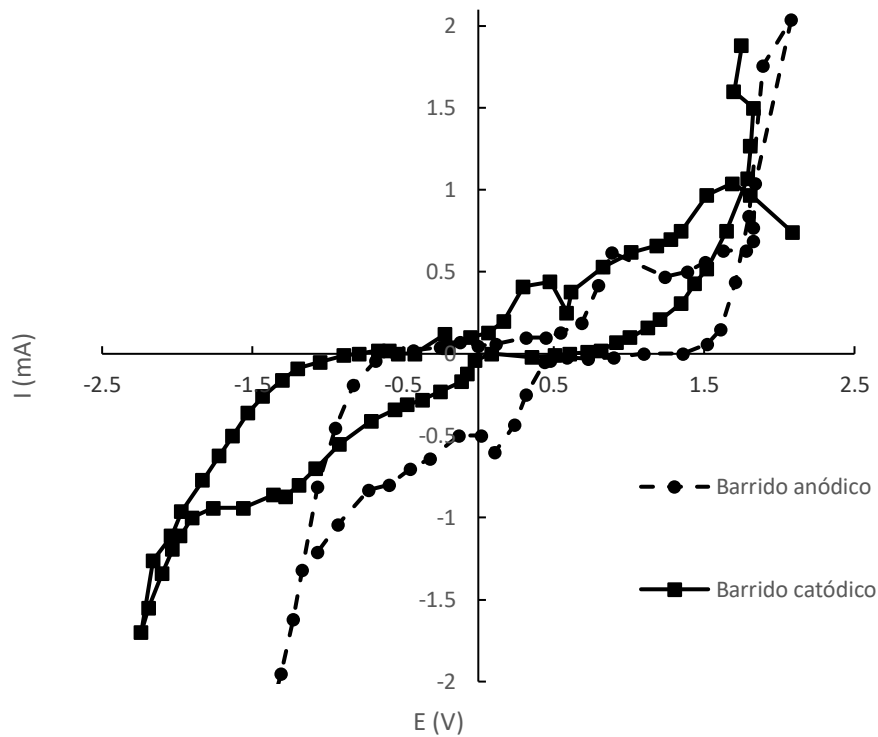
que velocidad de barrido es la más adecuado para el analito para las condiciones experimentales en las que se trabaja.

*Tabla 22. Datos registrados durante la voltamperometría cíclica en 100  $\mu$ L del electrolito soporte  $KNO_3$  0.1 F con 60  $\mu$ L de  $I_2/KI$  0.1 M, barrido en sentido positivo (Tiempo de muestreo: 10 s, ET: barra de grafito, ER: Barra de acero inoxidable y EA: Barra de acero inoxidable).*

<i>Orden de los datos</i>	<i>E (V)</i>	<i>I (mA)</i>	<i>Orden de los datos</i>	<i>E (V)</i>	<i>I (mA)</i>
1	-1.34	-2.05	27	1.84	1.04
2	-1.31	-1.95	28	2.08	2.04
3	-1.23	-1.62	29	1.89	1.76
4	-1.17	-1.32	30	1.8	0.84
5	-1.07	-0.81	31	1.71	0.44
6	-0.95	-0.45	32	1.61	0.15
7	-0.83	-0.19	33	1.52	0.06
8	-0.68	-0.04	34	1.36	0
9	-0.43	0.02	35	1.1	0
10	-0.25	0.04	36	0.9	-0.02
11	-0.12	0.07	37	0.73	-0.03
12	0	0.05	38	0.59	-0.02
13	0.12	0.06	39	0.48	-0.04
14	0.32	0.1	40	0.44	-0.05
15	0.45	0.1	41	0.32	-0.25
16	0.55	0.13	42	0.24	-0.43
17	0.69	0.19	43	0.11	-0.6
18	0.8	0.42	44	0.02	-0.5
19	0.89	0.62	45	-0.13	-0.5
20	1.24	0.47	46	-0.32	-0.64
21	1.39	0.5	47	-0.45	-0.7
22	1.51	0.56	48	-0.59	-0.8
23	1.63	0.63	49	-0.73	-0.83
24	1.78	0.63	50	-0.93	-1.04
25	1.83	0.69	51	-1.07	-1.21
26	1.83	0.77			

Tabla 23. Datos registrados durante el barrido triangular de potencial en 100  $\mu\text{L}$  del electrolito soporte  $\text{KNO}_3$  0.1 M con 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{I}_2/\text{KI}$  0.1 M, barrido en sentido negativo (Tiempo de muestreo: 10 s, ET: barra de grafito, ER: Barra de acero inoxidable y EA: Barra de acero inoxidable).

Orden de los datos	E (V)	I (mA)	Orden de los datos	E (V)	I (mA)	Orden de los datos	E (V)	I (mA)
1	1.75	1.88	26	-0.55	-0.34	51	-1.05	-0.05
2	1.7	1.6	27	-0.71	-0.41	52	-0.89	-0.01
3	1.83	1.5	28	-0.92	-0.55	53	-0.79	0
4	1.81	1.27	29	-1.08	-0.7	54	-0.66	0.02
5	1.79	1.07	30	-1.19	-0.8	55	-0.59	0.02
6	1.65	0.75	31	-1.28	-0.87	56	-0.53	0
7	1.52	0.52	32	-1.36	-0.86	57	-0.42	0
8	1.44	0.43	33	-1.56	-0.94	58	-0.22	0.12
9	1.35	0.31	34	-1.76	-0.94	59	-0.2	0.04
10	1.21	0.21	35	-1.9	-1	60	-0.05	0.1
11	1.13	0.16	36	-1.98	-1.11	61	0.07	0.13
12	1.01	0.1	37	-2.03	-1.19	62	0.17	0.2
13	0.92	0.07	38	-2.1	-1.34	63	0.3	0.41
14	0.82	0.02	39	-2.19	-1.55	64	0.48	0.44
15	0.73	0.01	40	-2.24	-1.7	65	0.59	0.25
16	0.61	0	41	-2.16	-1.26	66	0.62	0.38
17	0.51	-0.01	42	-2.04	-1.11	67	0.83	0.53
18	0.36	-0.02	43	-1.97	-0.96	68	1.02	0.62
19	0.09	0	44	-1.83	-0.77	69	1.19	0.66
20	-0.02	-0.04	45	-1.72	-0.62	70	1.28	0.7
21	-0.07	-0.12	46	-1.63	-0.5	71	1.35	0.75
22	-0.11	-0.17	47	-1.53	-0.36	72	1.52	0.97
23	-0.25	-0.23	48	-1.43	-0.26	73	1.69	1.04
24	-0.37	-0.28	49	-1.3	-0.16	74	1.81	0.97
25	-0.47	-0.31	50	-1.2	-0.09	75	2.09	0.74



Gráfica 53: Comparación de un barrido de potencial en sentido negativo y positivo para una disolución de 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{I}_3^-$  en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$  (*Tiempo de muestreo: 10 s, ET: barra de grafito, ER: Barra de acero inoxidable y EA: Barra de acero inoxidable*).

Se puede observar que el barrido anódico muestra de forma clara una tendencia típica para los voltamperogramas cíclicos teniendo una distribución más clara en sus puntos.

- 3.2.6. Resultados usando el potenciostato BAS CV-27:

- 3.2.6.1. *Análisis de  $I_3^-$  en  $KNO_3$  a distintas concentraciones*

En estos ensayos se pretende observar las variaciones de intensidad de corriente en función del potencial aplicado y de la concentración de la especie electroactiva con la que se trabaja ( $I_3^-$ ) utilizando el potenciostato BAS CV-27.

Los ensayos realizados al variar la concentración de  $I_3^-$  0.1 M y  $KNO_3$  0.1 M a 100 mV/s son:

Ensayo 1: 20  $\mu$ L  $I_3^-$  en 180  $\mu$ L  $KNO_3$  ( $I_3 = 0.01M$ )

Ensayo 2: 40  $\mu$ L  $I_3^-$  en 160  $\mu$ L  $KNO_3$

Ensayo 3: 60  $\mu$ L  $I_3^-$  en 140  $\mu$ L  $KNO_3$

Ensayo 4: 80  $\mu$ L  $I_3^-$  en 120  $\mu$ L  $KNO_3$

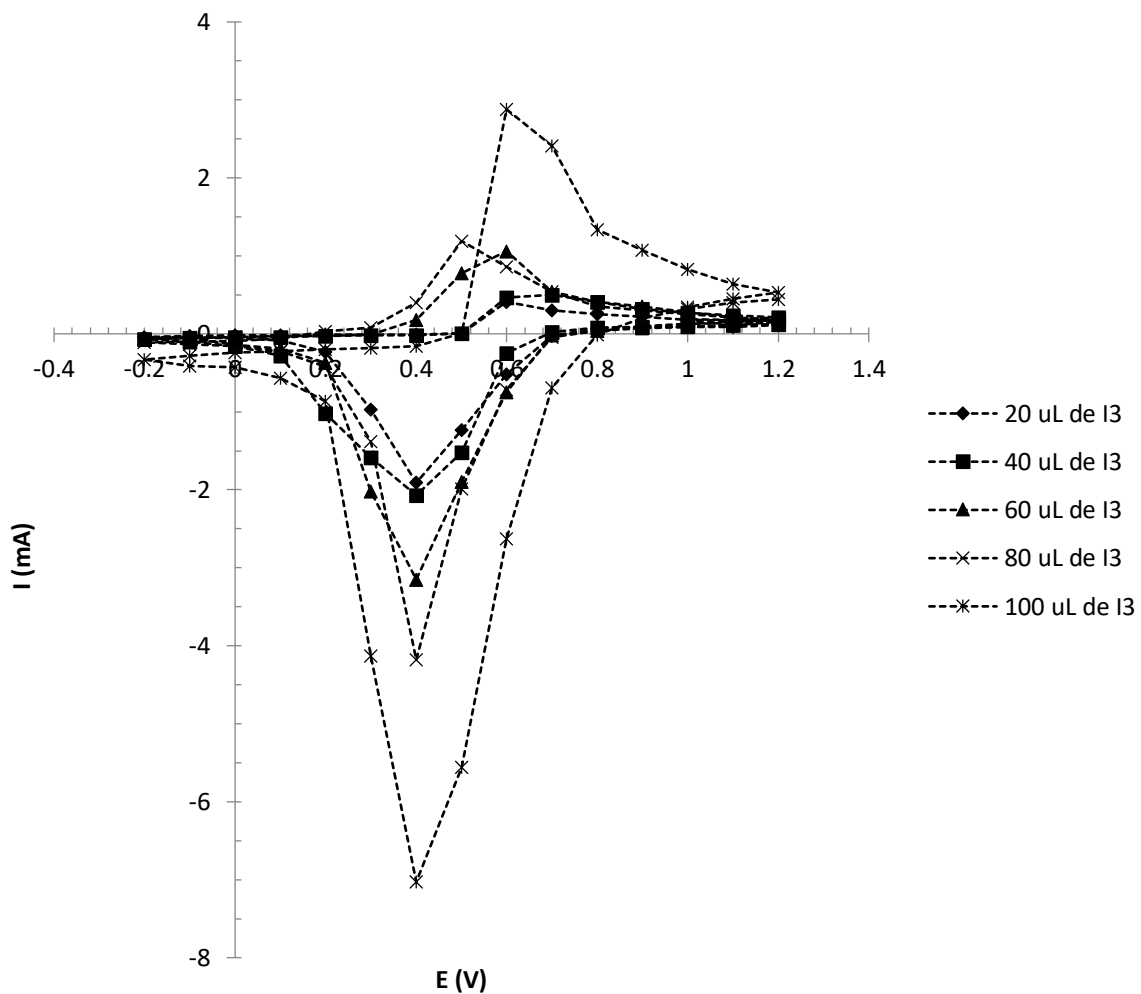
Ensayo 5: 100  $\mu$ L  $I_3^-$  en 100  $\mu$ L  $KNO_3$

En la tabla 24 y en la gráfica 54 se muestran los datos obtenidos de los voltamperogramas para la variación de concentraciones de  $I_3^-$  y  $KNO_3$  propuesta para los 5 ensayos.

Tabla 24. Datos registrados de los voltamperogramas correspondientes a los cinco ensayos donde se varia la concentración de  $I_3$  y  $KNO_3$  (Velocidad de barrido: 100 mV/s, ER: alambre de plata, ET: alambre de platino y EA: barra de acero inoxidable (aguja de jeringa).

Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4		Ensayo 5	
E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)
1.2	0.11	1.2	0.12	1.2	0.12	1.2	0.18	1.2	0.44
1.1	0.09	1.1	0.11	1.1	0.11	1.1	0.15	1.1	0.4
1	0.09	1	0.1	1	0.09	1	0.13	1	0.32
0.9	0.09	0.9	0.09	0.9	0.07	0.9	0.1	0.9	0.2
0.8	0.07	0.8	0.08	0.8	0.04	0.8	0.04	0.8	-0.01
0.7	-0.03	0.7	0.02	0.7	-0.02	0.7	-0.04	0.7	-0.69
0.6	-0.52	0.6	-0.25	0.6	-0.75	0.6	-0.72	0.6	-2.63
0.5	-1.23	0.5	-1.52	0.5	-1.9	0.5	-1.99	0.5	-5.56
0.4	-1.91	0.4	-2.07	0.4	-3.15	0.4	-4.18	0.4	-7.03
0.3	-0.97	0.3	-1.59	0.3	-2.02	0.3	-1.38	0.3	-4.13
0.2	-0.23	0.2	-1.02	0.2	-0.37	0.2	-0.42	0.2	-0.86
0.1	-0.08	0.1	-0.28	0.1	-0.19	0.1	-0.22	0.1	-0.57
0	-0.06	0	-0.16	0	-0.14	0	-0.16	0	-0.43
-0.1	-0.04	-0.1	-0.1	-0.1	-0.05	-0.1	-0.13	-0.1	-0.41
-0.2	-0.04	-0.2	-0.07	-0.2	-0.06	-0.2	-0.11	-0.2	-0.33
-0.1	-0.03	-0.1	-0.05	-0.1	-0.05	-0.1	-0.1	-0.1	-0.28
0	-0.02	0	-0.04	0	-0.04	0	-0.09	0	-0.24
0.1	-0.02	0.1	-0.04	0.1	-0.03	0.1	-0.06	0.1	-0.22
0.2	-0.01	0.2	-0.03	0.2	-0.03	0.2	0.03	0.2	-0.2
0.3	-0.01	0.3	-0.02	0.3	-0.01	0.3	0.08	0.3	-0.18
0.4	-0.01	0.4	-0.02	0.4	0.18	0.4	0.4	0.4	-0.16
0.5	0.01	0.5	0.01	0.5	0.78	0.5	1.19	0.5	0.01
0.6	0.41	0.6	0.47	0.6	1.06	0.6	0.86	0.6	2.88
0.7	0.3	0.7	0.5	0.7	0.54	0.7	0.54	0.7	2.41
0.8	0.25	0.8	0.41	0.8	0.41	0.8	0.35	0.8	1.34
0.9	0.22	0.9	0.32	0.9	0.35	0.9	0.3	0.9	1.07
1	0.18	1	0.27	1	0.28	1	0.25	1	0.83
1.1	0.17	1.1	0.24	1.1	0.21	1.1	0.21	1.1	0.64
1.2	0.18	1.2	0.21	1.2	0.15	1.2	0.18	1.2	0.53
1.1	0.14	1.1	0.18	1.1	0.11	1.1	0.18	1.1	0.45
1	0.13	1	0.16	1	0.1	1	0.19	1	0.34

En la gráfica 54 se muestran las variaciones de intensidad de corriente en función del potencial aplicado y de la concentración del analito  $I_3^-$  en medio de  $KNO_3$  0.1 M para cada uno de los voltamperogramas realizados de los cinco ensayos propuestos.



*Gráfica 54: Cinco voltamperogramas de  $I_3^-$  en  $KNO_3$  a distintas concentraciones. Velocidad de barrido: 100 mV/s, ER: alambre de plata, ET: alambre de platino y EA: barra de acero inoxidable (aguja de jeringa).*

- *3.2.6.2. Resultados de voltamperogramas cíclicos para a diferentes velocidades de barrido utilizando  $K_3[Fe(CN)_6]$  utilizando el potenciostato BAS CV-27.*

Al utilizar el potenciostato BAS CV-27 se pueden utilizar diferentes velocidades de barrido, lo que influye en la recolección de datos de un ensayo dando una mayor o menor confiabilidad en los resultados adquiridos.

En los siguientes ensayos se utilizaron 200  $\mu$ L de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.1 F en NaOH 0.1 F en todos los casos, variando únicamente las velocidades de barrido. Las velocidades de barrido se escogieron considerando que barridos menores a 25 mV/s tardan mucho tiempo, haciéndolos poco prácticos, y que solo se quiere observar el comportamiento por lo que se escogieron velocidades lo suficientemente separadas una de las otras para poder observar un cambio significativo.

Ensayo 1: Velocidad de barrido = 25 mV/s

Ensayo 2: Velocidad de barrido = 50 mV/s

Ensayo 3: Velocidad de barrido = 100 mV/s

Ensayo 4: Velocidad de barrido = 150 mV/s



Ensayo 5: Velocidad de barrido = 200 mV/s

Ensayo 6: Velocidad de barrido = 250 mV/s

Ensayo 7: Velocidad de barrido = 300 mV/s

Ensayo 8: Velocidad de barrido = 400 mV/s

Ensayo 9: Velocidad de barrido = 500 mV/s

En las tablas 25.1, 25.2 y 25.3, y en las gráficas 55 y 56 se muestran los datos obtenidos de los voltamperogramas cíclicos utilizando el potencióstato *BAS CV-27* realizados a distintas velocidades de barrido usando 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.1 F en  $\text{NaOH}$  0.1 F (ER: alambre de plata, ET: alambre de platino y EA: barra de acero inoxidable (aguja de jeringa)).

Tabla 25.1. Datos registrados de los voltamperogramas cíclicos realizados a las velocidades 25 y 50 mV/s.

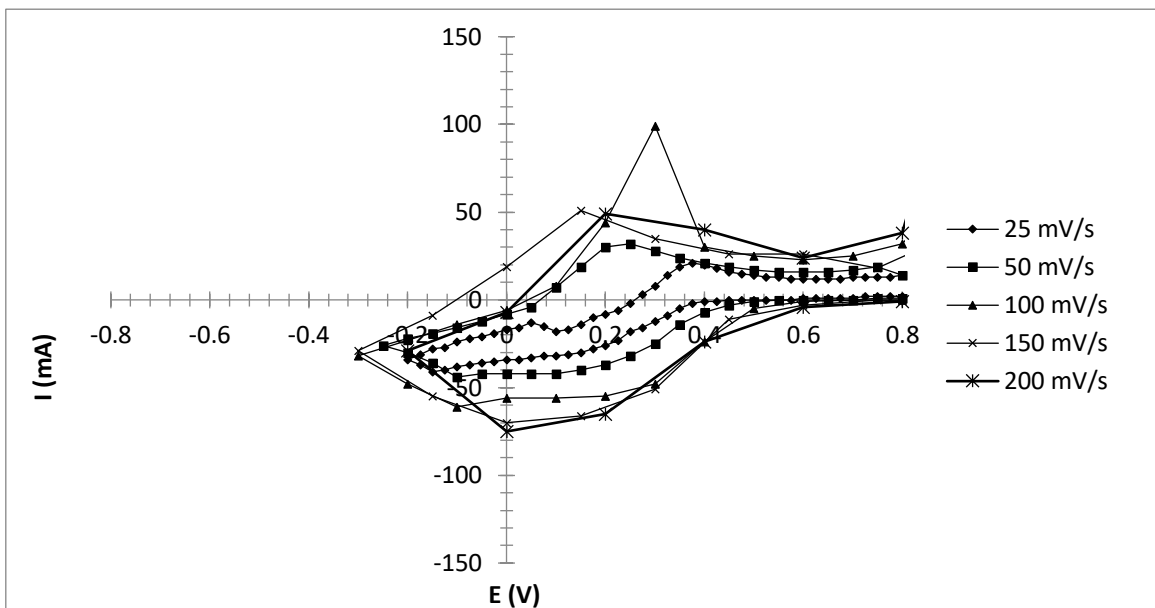
Velocidad de barrido = 25 mV/s						Velocidad de barrido = 50 mV/s					
E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)
1.2	22	0.45	0	-0.1	-24	0.65	12	1.2	20	-0.2	-22
1.175	16	0.425	-1	-0.075	-22	0.675	12	1.15	11	-0.15	-19
1.15	12	0.4	-1	-0.05	-21	0.7	13	1.1	7	-0.1	-16
1.125	10	0.375	-2	-0.025	-19	0.725	13	1.05	6	-0.05	-12
1.1	8	0.35	-5	0	-17	0.75	13	1	4	0	-8
1.075	7	0.325	-9	0.025	-16	0.775	13	0.95	3	0.05	-4
1.05	6	0.3	-12	0.05	-13	0.8	14	0.9	2	0.1	7
1.025	6	0.275	-16	0.075	-15	0.825	15	0.85	2	0.15	19
1	5	0.25	-18	0.1	-18	0.85	15	0.8	1	0.2	30
0.975	5	0.225	-23	0.125	-17	0.875	16	0.75	1	0.25	32
0.95	4	0.2	-26	0.15	-14	0.9	17	0.7	0	0.3	28
0.925	4	0.175	-28	0.175	-10	0.925	18	0.65	0	0.35	24
0.9	3	0.15	-30	0.2	-8	0.95	20	0.6	0	0.4	21
0.875	3	0.125	-31	0.225	-6	0.975	22	0.55	0	0.45	19
0.85	3	0.1	-32	0.25	-2	1	25	0.5	-1	0.5	17
0.825	3	0.075	-32	0.275	3	1.025	31	0.45	-3	0.55	16
0.8	2	0.05	-33	0.3	8	1.05	37	0.4	-7	0.6	16
0.775	2	0.025	-34	0.325	14	1.075	45	0.35	-14	0.65	16
0.75	2	0	-34	0.35	19	1.1	58	0.3	-25	0.7	17
0.725	2	-0.025	-35	0.375	21	1.125	73	0.25	-32	0.75	19
0.7	1	-0.05	-36	0.4	20	1.15	101	0.2	-37	0.8	14
0.675	1	-0.075	-37	0.425	18	1.175	135	0.15	-40	0.85	17
0.65	1	-0.1	-38	0.45	16	1.2	125	0.1	-42	0.9	22
0.625	1	-0.125	-40	0.475	15	1.225	85	0.05	-42	0.95	30
0.6	1	-0.15	-41	0.5	14	1.25	73	0	-42	1	53
0.575	0	-0.175	-37	0.525	13	1.275	51	-0.05	-42	1.05	88
0.55	0	-0.2	-34	0.55	13	1.3	36	-0.1	-44	1.1	147
0.525	0	-0.175	-31	0.575	12	1.325	25	-0.15	-36	1.15	63
0.5	0	-0.15	-28	0.6	12	1.35	18	-0.2	-30	1.2	17
0.475	0	-0.125	-27	0.625	12			-0.25	-26		

Tabla 25.2. Datos registrados de los voltamperogramas cíclicos realizados a las velocidades 100, 150 y 200 mV/s.

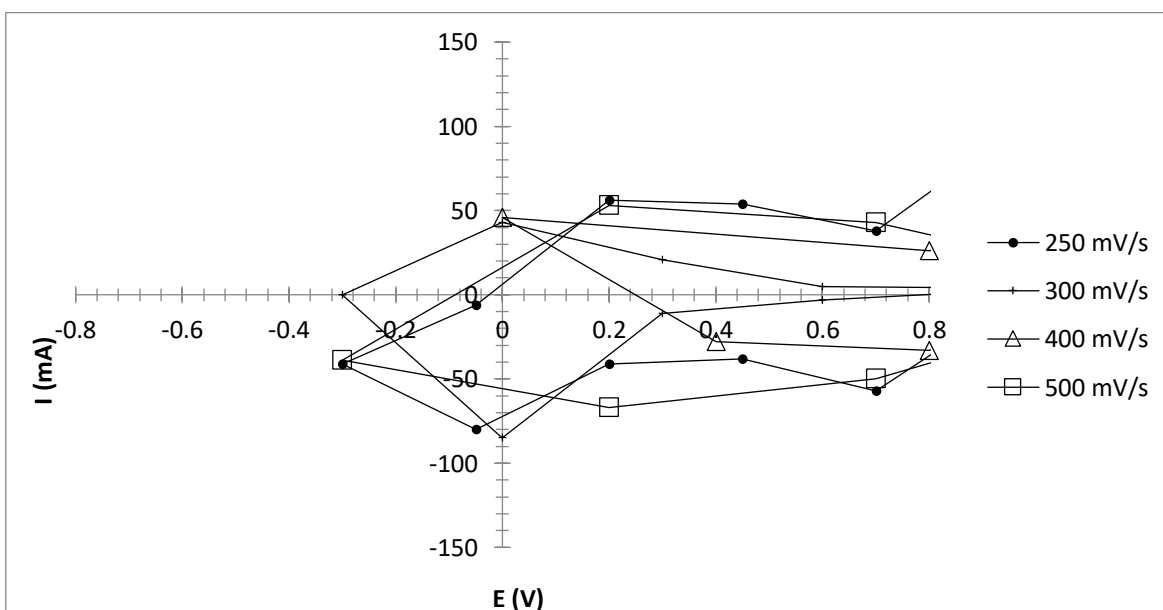
Velocidad de barrido = 100 mV/s		Velocidad de barrido = 150 mV/s		Velocidad de barrido = 200 mV/s	
E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)
1.2	20	1.2	15	1.2	22
1.1	8	1.05	3	1	2
1	3	0.9	0	0.8	-1
0.9	1	0.75	0	0.6	-4
0.8	0	0.6	-3	0.4	-24
0.7	0	0.45	-11	0.2	-65
0.6	-1	0.3	-51	0	-75
0.5	-5	0.15	-66	-0.2	-29
0.4	-24	0	-70	0	-7
0.3	-48	-0.15	-55	0.2	49
0.2	-55	-0.3	-29	0.4	40
0.1	-56	-0.15	-9	0.6	24
0	-56	0	19	0.8	38
-0.1	-61	0.15	51	1	234
-0.2	-48	0.3	35	1.2	208
-0.3	-32	0.45	26		
-0.2	-23	0.6	26		
-0.1	-14	0.75	18		
0	-6	0.9	37		
0.1	8	1.05	269		
0.2	44	1.2	29		
0.3	99				
0.4	30				
0.5	25				
0.6	23				
0.7	25				
0.8	32				
0.9	63				
1	167				
1.1	52				
1.1	52				
1.2	18				

Tabla 25.3. Datos registrados de los voltamperogramas cíclicos realizados a las velocidades 250, 300, 400 y 500 mV/s.

Velocidad de barrido = 250 mV/s		Velocidad de barrido = 300 mV/s		Velocidad de barrido = 400 mV/s		Velocidad de barrido = 500 mV/s	
E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)	E (V)	I (mA)
1.2	0	1.2	16	1.2	1	1.2	-4
0.95	-5	0.9	2	0.8	-33	0.7	-50
0.7	-57	0.6	-3	0.4	-28	0.2	-67
0.45	-38	0.3	-11	0	46	-0.3	-39
0.2	-41	0	-85	0.8	26	0.2	53
-0.05	-80	-0.3	0	1.2	54	0.7	43
-0.3	-41	0	43			1.2	7
-0.05	-6	0.3	21				
0.2	56	0.6	5				
0.45	54	0.9	4				
0.7	38						
0.95	95						
1.2	12						



Gráfica 55: Comparación de los voltamperogramas para  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0.1\text{ F}$  en  $NaOH\ 0.1\text{ F}$  a las velocidades de barrido de  $25$ ,  $50$ ,  $100$ ,  $150$  y  $200\text{ mV/s}$ .



Gráfica 56: Comparación de los voltamperogramas para  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0.1\text{ F}$  en  $NaOH\ 0.1\text{ F}$  a las velocidades de barrido de  $250$ ,  $300$ ,  $400$  y  $500\text{ mV/s}$ .

En las gráficas 55 y 56 se muestra como son los datos adquiridos a diferentes a diferentes velocidades de barrido. En la gráfica 55 se puede apreciar los picos, forma y curvas típicas de un voltamperograma cíclico; entre menor es la velocidad del barrido más definido resulta el voltamperograma y, en viceversa, entre mayor es la velocidad de barrido es más difícil que el voltamperograma se aprecie de manera adecuada.

Considerando los resultados obtenidos no es recomendable confiar en los registros obtenidos para velocidades de barrido superiores a los 200 mV/s. Para los registros con velocidades de barrido menores a los 200 mV/s los registros serán más definidos y confiables, pero usarlos dependerá de la disponibilidad de tiempo para el trabajo. En este caso la velocidad de barrido escogida para los registros tomados utilizando el potencióstato BAS CV-27 es de 100 mV/s.

- *3.2.6.3. Resultados de la relación entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y la altura de pico de corriente.*

Se estudió la relación entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ) y la altura de corriente de pico ya que, para una reacción electroquímica, esta relación tiene un comportamiento lineal.

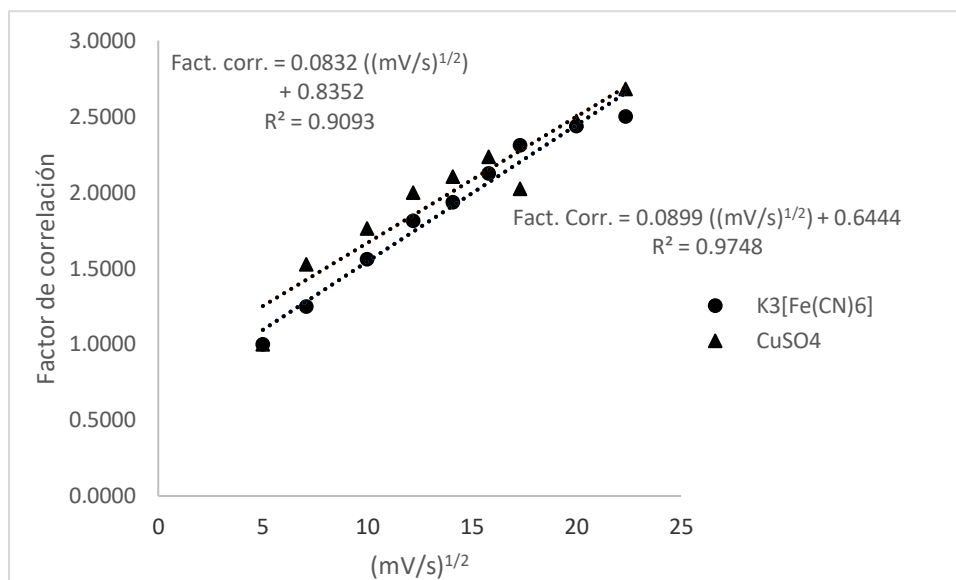
Se realizaron voltamperogramas cíclicos de dos disoluciones; una disolución de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.1 M en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  0.1M y una 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  0.1 M en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.05 M. Los electrodos utilizados en ambos casos son; ER: alambre de plata, ET: alambre de platino y EA: barra de acero inoxidable.

- Condiciones de los voltamperogramas:
  - Disolución de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 
    - sensibilidad de 0.1-0.2
    - Potencial inicial de 1.10 V
    - Potencial final -0.25 V
  - Disolución de  $\text{CuSO}_4$ 
    - sensibilidad de 0.2-0.5
    - Potencial inicial de 0.80 V
    - Potencial final -1.1 V

Tabla 26. Factor de correlación calculado con la ecuación 13 a partir de las alturas de corriente pico obtenidas para las disoluciones de  $K_3[Fe(CN)_6]$  y de  $CuSO_4$  a diferentes velocidades de barrido.

Velocidad de barrido (mV/s)	Raíz cuadrada de la Velocidad de barrido $[(mV/s)^{1/2}]$	Factor de correlación para las alturas de corriente de pico anódico ( $K_3[Fe(CN)_6]$ )	Factor de correlación para las alturas de corriente de pico anódico ( $CuSO_4$ )
25	5	1	1
50	7.07	1.25	1.5263
100	10	1.5625	1.7632
150	12.2	1.8125	2
200	14.1	1.9375	2.1053
250	15.8	2.125	2.2368
300	17.3	2.3125	2.0263
400	20	2.4375	2.4737
500	22.36	2.5	2.6842





Gráfica 57: Dependencia de las alturas de pico anódico con variación de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para 100 µL de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 0.1 M en NaOH 0.1M y 100 µL de CuSO<sub>4</sub> 0.1 M en 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 M utilizando el potenciostato BAS CV-27.

En la gráfica anterior se puede observar la relación lineal que tiene las alturas de pico anódico con respecto la raíz cuadrada de velocidad de barrido del voltamperograma con las disoluciones utilizadas.

- 3.2.7. Conclusiones particulares

Se pudo comprobar el buen funcionamiento de los equipos utilizados por medio de los voltamperogramas obtenidos para la celda ficticia.

Se pudieron estudiar las especies triyoduro de potasio, ferricianuro de potasio y sulfato de cobre utilizando voltamperogramas lineales,

voltamperogramas cíclicos y cambiando las velocidades del barrido de potencial de forma exitosa.

Mediante los voltamperogramas cíclicos se puede observar la diferencia de comportamiento de las diferentes concentraciones de  $I_3^-$ .

Se logro relacionar de manera lineal la raíz cuadrada de la velocidad de barrido con la altura de corriente de pico anódico y se obtuvo con un buen coeficiente de regresión lineal lo que implica que los procesos estudiados son reversibles e involucran a especies redox en difusión libre.

El MIMP puede usarse para realizar y analizar voltamperogramas tal y como se hace con el potenciostato BAS CV-27 con las diferencias de un bajo costo y una mayor versatilidad en la utilización del MIMP, por los materiales con los que está construido, mientras que no se puede controlar la velocidad de barrido tal y como se hace con el potenciostato BAS CV-27.

### - 3.3. Curvas de calibración micropotenciométricas.

- 3.3.1. *Objetivos particulares.*

Registrar con un ET de  $W^0$  y un ER de  $[Ag/AgCl_{(s)}, KNO_3 \text{ (Sat.)}]$  de las variaciones de potencial debido a cambios en la concentración de iones hidronios correspondientes a los siguientes sistemas: HCl-NaOH, biftalato de potasio-NaOH y  $Na_2CO_3$ -HCl.

Mostrar el comportamiento del ER plata / cloruro de plata,  $[Ag/AgCl_{(s)}, KNO_3 \text{ (Sat.)}]$  con el ET  $Ag_2O_{(s)}/Ag_{(s)}$  para la detección del ion cloruro.

Registrar las variaciones de concentración de iones cloruro utilizando el sistema ER  $[Ag/AgCl_{(s)}, KNO_3 \text{ (Sat.)}]$  con ET  $Ag_2O_{(s)}/Ag_{(s)}$ .

- 3.3.2. *Hipótesis particular.*

El empleo de ISE para la detección de los iones diana  $H^+$  y  $Cl^-$  ha sido documentado de forma exitosa en varios casos (Akhtar, E., Baeza Reyes, Qazi & Escobar, 2003), (Baeza, 2003) y (Olvera García, García Mendoza, Santiago Zárate & Baeza, 2016). Con base en esto, se propone la reducción del volumen hasta los 300  $\mu$ L de las disoluciones a estudiar y con electrodos de bajo costo se obtendrán curvas de titulación que permitan la detención de diferentes concentraciones de las especies  $H^+$  y  $Cl^-$ .

- 3.3.3. Materiales.

- Nitrato de potasio, Aldrich chemical company Inc., Lote 01414JF,  $\text{KNO}_3$  101.11 g mol<sup>-1</sup>
- Hidróxido de sodio (lentejas), R.A., Productos Químicos Monterrey, Lote 002007, NaOH 40 g mol<sup>-1</sup>
- Ácido clorhídrico, SIGMA-ALDRICH, México, S.A., Lote SHBG2446V, HCl, 36.5-38%
- Cloruro de potasio, R.A., Productos Químicos Monterrey, KCl 74.56 g mol<sup>-1</sup>
- Cloruro de sodio, estándar, Merk, NaCl, 58.45 g mol<sup>-1</sup>
- Carbonato de sodio, J.T. Baker, Lote M-30804,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  105.993 g mol<sup>-1</sup>
- Biftalato de potasio, J.T. Baker, Lote 324065-A,  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  204.228 g mol<sup>-1</sup>
- Puntas de micropipeta automática
- Alambre de plata 1.0 mm de diámetro
- Electrodo de tungsteno, color: verde, pureza > 99.8%
- Alambre de cobre convencional de grosor 3 mm

- Agua potable para realizar disoluciones y lavados pertinentes
- Jeringa plástica de insulina de 1.0 mL
- Placa de microtitulación de poliestireno fondo plano con 96 pozos, PF 1003-F
- Multímetro Steren Mul-010
- Cables con pinzas caimán
- Cables con pinza caimán y pin plátano
- Jacks tipo banana
- Acrílico
- Brazo de plástico articulado
- Cinta de aislar modelo PI-13 NE
- Cargador Samsung, modelo ATADS30JBS, Potencial de salida 7 V, modificado para tener pinzas caimán en lugar de la terminación estándar.

- 3.3.4. Resultados para la detección de iones H<sup>+</sup>.

En este caso los datos obtenidos de la medición del potencial en la disolución se utilizan para el cálculo del pH en disolución mediante un ajuste de la ecuación de Nikolsky para utilizarla como ecuación de la recta:

Ecuación de Nikolsky

$$E = C_N + \frac{RT(\ln 10)}{zF} \log [i] \text{ ...Ecuación 14}$$

Por analogía con la ecuación de la recta:

$$E = b + m \text{ pH} \text{ ...Ecuación 15}$$

Por tanto, al despejar el pH se tiene:

$$\text{pH} = \frac{E - b}{m} \text{ ...Ecuación 16} \quad \text{con } m = \frac{RT(\ln 10)}{zF} \text{ y } b = C_N$$

Donde:

- C<sub>N</sub>: constante de Nikolsky
- R: constante del gas ideal equivalente a 8.3145 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>
- T: temperatura absoluta, K
- z: carga del ion
- F: constante de Faraday equivalente a 9.6485 x 10<sup>4</sup> C mol<sup>-1</sup>

- b: ordenada al origen
- m: pendiente de la recta
- E: potencial

Para determinar el pH se necesitan los valores de potencial de las disoluciones en el ensayo, la pendiente y la ordenada al origen. Los valores de la pendiente y de la ordenada al origen para cada ensayo se obtienen graficando los valores de potencial con respecto al pH de dos disoluciones de pH conocido. Estos pH's son valores límite, es decir, incluyen en su intervalo los valores de todas las disoluciones a las que se quiere determinar el pH. Con la gráfica obtenida, se realiza un análisis por regresión lineal para obtener la ecuación de la recta para estos dos puntos límite y con esto los valores de la pendiente y la ordenada al origen. Estos valores son válidos siempre y cuando se trabaje dentro de este intervalo de pH y con las mismas especies en disolución.

En todos los ensayos realizados para determinar los valores de la pendiente y la ordenada al origen, se deberán medir la primera y la última disolución con los valores de las disoluciones límite (las disoluciones límite son las disoluciones preparadas para tener un pH conocido lo más precisamente posible y que se encuentran justo fuera del rango de valores de pH que se desea medir, estas disoluciones están hechas de los mismos

reactivos con los que se llevara a cabo la calibración). Estas disoluciones al ser el primer y último valor del rango de pH en la calibración, se vuelven a medir en el orden en el que se lleva a cabo el ensayo para incluirlas en los resultados de detección de iones  $H^+$ .

○ *3.3.4.1. Ensayos de la titulación HCl con NaOH.*

En este ensayo se utilizaron 16 pozos de una placa de microtitulación. En el primer pozo se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de HCl 0.1 F y en los pozos siguientes se fueron reemplazando de 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de HCl 0.1 M en 20  $\mu\text{L}$  por 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 F. Para calcular el pH a partir de los potenciales obtenidos por cada una de las disoluciones en los pozos primero se requiere calcular la pendiente y la ordenada al origen por medio de la ecuación 16 en cada ensayo con ayuda de las disoluciones límite, que en este caso son las disoluciones en los pozos con 300  $\mu\text{L}$  de HCl 0.1 F y 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 F. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 27 y 28.



Tabla 27. Datos de potencial obtenidos con las disoluciones límite para el sistema HCl-NaOH.

Número de ensayo	Valores de potencial registrados		Datos calculados	
	pH = 1	pH = 13	Pendientes	Ordenadas al origen
1	171	-289	-38.333	209.33
2	171	-287	-38.167	209.17
3	173	-290	-38.583	211.58
4	157	-296	-37.75	194.75
5	152	-289	-36.75	188.75
6	137	-276	-34.417	171.42
7	147	-301	-37.333	184.33

Tabla 28. Datos determinados de pH usando la ecuación 16 y los datos de la tabla 27 para las curvas de calibración potenciométricas del sistema HCl-NaOH planteado.

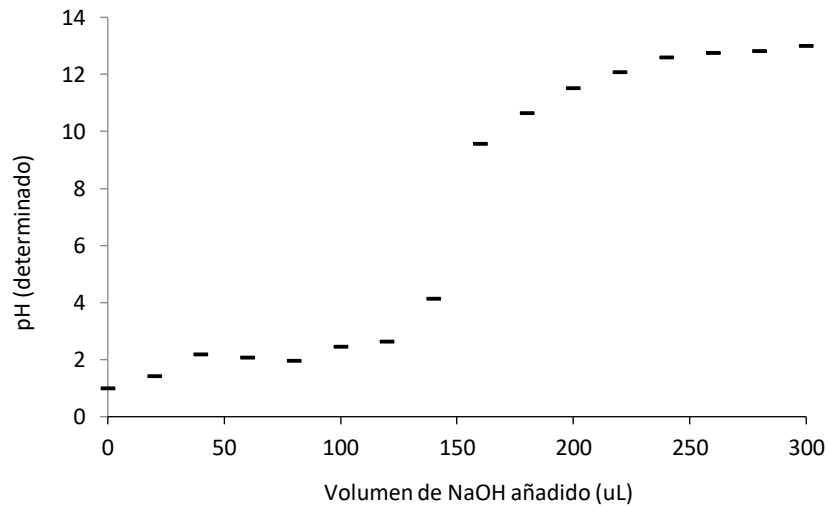
Volumen de NaOH agregado ( $\mu\text{L}$ )	Número de ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
0	0.9999	1.0001	0.9999	1.0000	1.0000	1.0001	0.9999
20	1.6260	1.6551	1.8034	1.4238	1.1905	1.1163	1.1606
40	2.7999	2.6769	2.8660	1.9007	1.9524	1.4069	1.6964
60	2.9043	2.1267	2.1144	1.9801	1.9796	1.6974	1.6160
80	1.9130	2.3101	2.3477	2.0596	2.0612	1.3197	1.7499
100	2.3565	2.9127	2.9956	2.2450	2.3605	2.1332	2.0981
120	3.1130	3.0699	3.0993	2.5364	2.1973	2.3076	2.1517
140	4.6000	4.5896	4.6025	4.0728	3.9932	3.5860	3.4642
160	11.1478	11.1921	11.1080	4.4172	9.5986	9.6005	9.8661
180	11.4348	11.3755	11.2376	9.9536	10.1429	10.1525	10.1607
200	12.2174	12.2402	12.1188	11.3046	10.9048	10.9661	10.8304
220	12.4522	12.5284	12.4557	12.0199	11.9932	11.5472	11.4732
240	12.8435	12.9214	12.8186	12.2583	12.6190	12.9419	11.7679
260	12.9739	12.9476	12.9482	12.4437	12.8367	12.6223	12.4107
280	12.7131	12.7642	12.6372	13.1854	13.0272	12.7966	12.6250
300	13.0000	13.0000	13.0000	13.0000	13.0000	13.0000	13.0000

Las gráficas de la 58 a la 64, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos del sistema HCl-NaOH.

A continuación, se calculó el promedio de los pH's determinados y los resultados se muestran en la tabla 29 y en la gráfica 65.

*Tabla 29. Promedio de los datos obtenidos con las disoluciones en la placa de microtitulación para el sistema HCl-NaOH.*

<i>Volumen de NaOH agregado (<math>\mu</math>L)</i>	<i>Promedio de los pH's determinados en los ensayos</i>
0	1.0000
20	1.4251
40	2.1856
60	2.0598
80	1.9659
100	2.4431
120	2.6393
140	4.1298
160	9.5615
180	10.6368
200	11.5117
220	12.0671
240	12.5958
260	12.7404
280	12.8212
300	13.0000



*Gráfica 65: Curva de calibración con los valores promedio del pH de los ensayos para el sistema HCl-NaOH.*

La correlación utilizada en los valores de potencial obtenidos muestra ligeras diferencias en los valores de pH determinados haciendo que las curvas de calibración HCl-NaOH obtenidas sean similares. En cada ensayo se mantiene la curva de titulación típica de HCl con NaOH.

- 3.3.4.2. Ensayos de la titulación de biftalato de potasio con NaOH.

En el experimento se utilizaron 16 pozos de una placa de microtitulación, para ello, en el primer pozo se colocaron 300 µL (capacidad total de un pozo) de biftalato de potasio. En los pozos siguientes se fueron

reemplazando 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de biftalato 0.1 F con 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 F. Para calcular el pH a partir de los potenciales obtenidos por cada una de las disoluciones en los pozos primero se requiere calcular la pendiente y la ordenada al origen por medio de la ecuación 16 en cada ensayo con ayuda de las disoluciones límite, que en este caso son las disoluciones en los pozos con 300  $\mu\text{L}$  de biftalato de potasio 0.1 F y 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 F. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 30 y 31.

*Tabla 30. Datos obtenidos con las disoluciones límite para el sistema biftalato de potasio-NaOH.*

<i>Número de ensayo</i>	<i>Valores de potencial registrados</i>		<i>Datos calculados</i>	
	<i>pH = 3.2</i>	<i>pH = 13</i>	<i>Pendientes</i>	<i>Ordenadas al origen</i>
<i>1</i>	67	-267	-34.082	176.06
<i>2</i>	91	-239	-33.673	198.76
<i>3</i>	90	-240	-33.673	197.76
<i>4</i>	90	-240	-33.673	197.76
<i>5</i>	77	-234	-31.735	178.55
<i>6</i>	79	-235	-32.041	181.53
<i>7</i>	89	-234	-32.143	183.86

Tabla 31. Datos de pH determinados con la ecuación 16 y con los datos de la tabla 30 para las disoluciones en la placa de microtitulación para el sistema biftalato de potasio-NaOH.

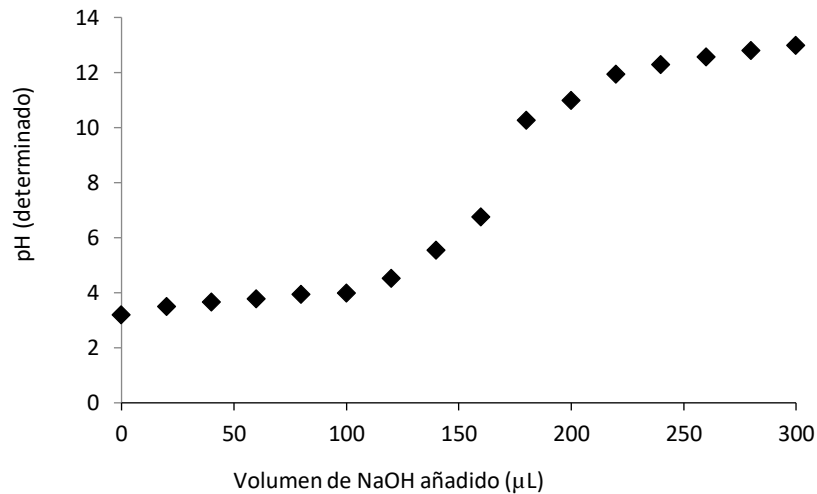
Volumen de NaOH agregado ( $\mu\text{L}$ )	Número de ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
0	3.1999	3.2002	3.2002	3.2002	3.1999	3.2000	3.2001
20	3.6987	3.4378	3.4081	3.4081	3.4835	3.5745	3.6045
40	4.0508	3.5566	3.5269	3.5566	3.6411	3.6369	3.6667
60	4.0508	3.7347	3.7050	3.7050	3.7671	3.7617	3.7912
80	4.1388	4.0317	4.0020	4.0020	3.7986	3.7930	3.8223
100	4.3736	3.9723	3.9129	3.9129	3.9562	3.9490	3.9778
120	5.0191	4.5069	4.5069	4.4772	4.4289	4.4172	4.4134
140	5.3418	5.3978	5.3978	5.3978	5.7523	5.8216	5.8445
160	6.8089	6.4669	6.4372	6.4966	6.9813	7.0388	7.0889
180	10.6819	10.3573	10.2979	10.2682	10.1323	10.1286	10.1378
200	11.0340	11.0403	11.0106	11.0403	10.9201	10.9400	10.9778
220	12.0903	12.1391	12.0500	12.0203	11.7709	11.7203	11.7867
240	12.6477	12.4658	12.4361	12.4064	12.0545	12.0012	12.0667
260	12.8238	12.6143	12.6440	12.6440	12.4011	12.4069	12.4400
280	12.8825	12.8221	12.8221	12.8221	12.7478	12.7502	12.8445
300	12.9998	13.0003	13.0003	13.0003	12.9998	12.9999	13.0000

Las gráficas de la 66 a la 72, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos del sistema HCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

A continuación, se calculó el promedio de los pH's determinados y los resultados se muestran en la tabla 32 y en la gráfica 73.

*Tabla 32. Promedio de los datos obtenidos con las disoluciones en la placa de microtitulación para el sistema biftalato de potasio-NaOH.*

<i>Volumen de NaOH agregado (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>Promedio de los pH's determinados en los ensayos</i>
0	3.2001
20	3.5165
40	3.6622
60	3.7880
80	3.9412
100	4.0078
120	4.5385
140	5.5648
160	6.7598
180	10.2863
200	10.9947
220	11.9397
240	12.2969
260	12.5677
280	12.8130
300	13.0001



*Gráfica 73: Curva de calibración con los valores promedio del pH los ensayos para el sistema biftalato de potasio-NaOH.*

Se puede observar en la tabla y en la gráfica promedio que el pH inicial de la titulación es mayor comparado con la anterior curva y que el punto de equivalencia se desplazó como consecuencia de la debilidad del ácido. Además, en el principio de la curva (entre los 10 y 130 µL agregados) se puede apreciar que existe muy poca variación entre los valores de pH debido a que es la zona con la capacidad amortiguadora del biftalato de potasio.

- 3.3.4.3. Ensayos de la titulación de HCl con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

En este experimento se utilizaron 16 pozos de una placa de microtitulación, para ello, en el primer pozo se colocaron 300 µL (capacidad total de un pozo) de HCl 0.1 F y en los pozos siguientes se

fueron remplazando de 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de HCl 0.1 F en 20  $\mu\text{L}$  por 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 F. Para calcular el pH a partir de los potenciales obtenidos por cada una de las disoluciones en los pozos primero se requiere calcular la pendiente y la ordenada al origen por medio de la ecuación 16 en cada ensayo con ayuda de las disoluciones límite, que en este caso son las disoluciones en los pozos con 300  $\mu\text{L}$  de HCl 0.1 F y 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 F. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 33 y 34.

*Tabla 33. Datos de potencial obtenidos con las disoluciones límite para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .*

<i>Número de ensayo</i>	<i>Valores de potencial registrados</i>		<i>Datos calculados</i>	
	<i>pH = 1</i>	<i>pH = 11.65</i>	<i>Pendientes</i>	<i>Ordenadas al origen</i>
1	103	-375	-44.883	147.88
2	101	-373	-44.507	145.51
3	104	-370	-44.507	148.51
4	104	-227	-31.08	135.08
5	97	-227	-30.423	127.42
6	102	-227	-30.892	132.89
7	103	-246	-32.77	135.77



Tabla 34. Datos de pH determinados con la ecuación 16 y con los datos de la tabla 33 para las disoluciones en la placa de microtitulación para el sistema HCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

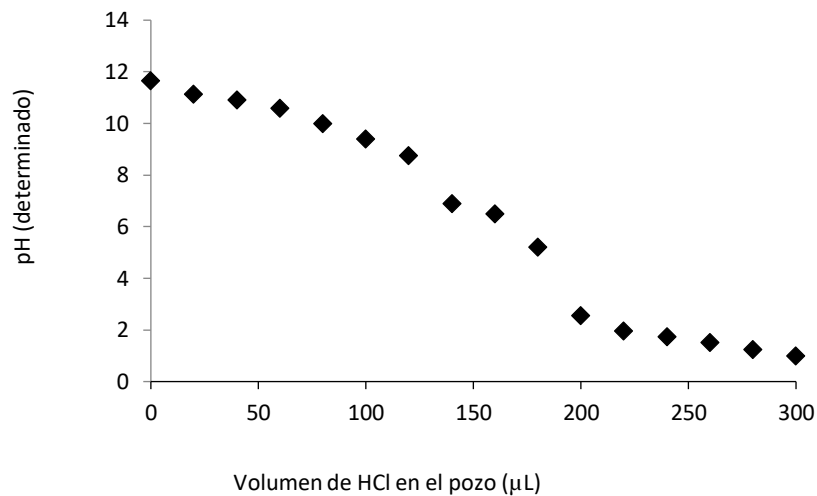
Volumen de HCl en el pozo (μL)	Número de ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
300	0.9999	1.0001	1.0001	1.0000	0.9999	0.9999	1.0000
280	1.2896	1.1798	1.2922	1.2896	1.0656	1.1942	1.4883
260	1.4901	1.4494	1.5393	1.4505	1.3286	1.4208	1.9460
240	1.7352	1.6517	1.6741	1.7400	1.4601	1.6150	2.2817
220	2.0694	1.9887	2.1235	1.6113	1.4601	1.6797	2.8615
200	2.7155	2.6852	2.6627	1.9653	1.7230	1.9387	4.2347
180	4.7430	4.7972	4.7523	5.2793	5.1744	5.3376	6.4013
160	5.8793	5.8308	5.8532	7.1454	6.9493	6.9562	6.9200
140	6.5031	6.4374	6.4374	7.2098	7.1137	7.1828	7.3778
120	8.5083	8.4596	8.4820	8.9472	9.0530	9.1250	8.7205
100	9.1545	9.1336	9.1786	9.7516	9.7762	9.8695	9.0256
80	9.6001	9.4931	9.4257	10.6525	10.5650	10.5493	9.6970
60	10.2016	10.1672	10.2121	11.1673	11.2224	11.1644	10.0937
40	10.5581	10.5716	10.5941	11.2960	11.2882	11.2939	10.7345
20	10.9146	10.8862	10.9311	11.6178	11.5511	11.5205	10.5514
0	11.6498	11.6501	11.6501	11.6499	11.6497	11.6499	11.6500

Las gráficas de la 74 a la 80, que se encuentran en el anexo, muestran los resultados para cada uno de los ensayos del sistema HCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

A continuación, se calculó el promedio de los pH's determinados y los resultados se muestran en la tabla 35 y en la gráfica 81.

*Tabla 35. Promedio de los datos obtenidos con las disoluciones en la placa de microtitulación para el sistema HCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.*

<i>Volumen de HCl en el pozo (μL)</i>	<i>Promedio de los pH's determinados en los ensayos</i>
300	1.0000
280	1.2570
260	1.5178
240	1.7368
220	1.9706
200	2.5607
180	5.2122
160	6.5049
140	6.8946
120	8.7565
100	9.4128
80	9.9975
60	10.6041
40	10.9052
20	11.1389
0	11.6499



*Gráfica 81: Curva de calibración a partir de los promedios de pH de los ensayos para el sistema HCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.*

Las curvas obtenidas de la titulación de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con HCl muestran claramente dos intervalos (entre los 130 a 140 µL y entre los 170 y 200 µL) en donde las variaciones de pH son más grandes que en el resto de la curva. Estos cambios son debido a la interacción de bicarbonato y carbonato con el ácido clorhídrico en sus correspondientes puntos de equivalencia.

- 3.3.5. *Resultados para la determinación de iones Cl<sup>-</sup>*

Las valoraciones con Ag<sup>+</sup> se llaman titulaciones argentométricas. Se realizó una titulación argentométrica para la detección de Cl<sup>-</sup> mediante su reacción con AgNO<sub>3</sub>, por tanto, se primero se probará la capacidad de detección de iones Cl<sup>-</sup> del electrodo de trabajo.

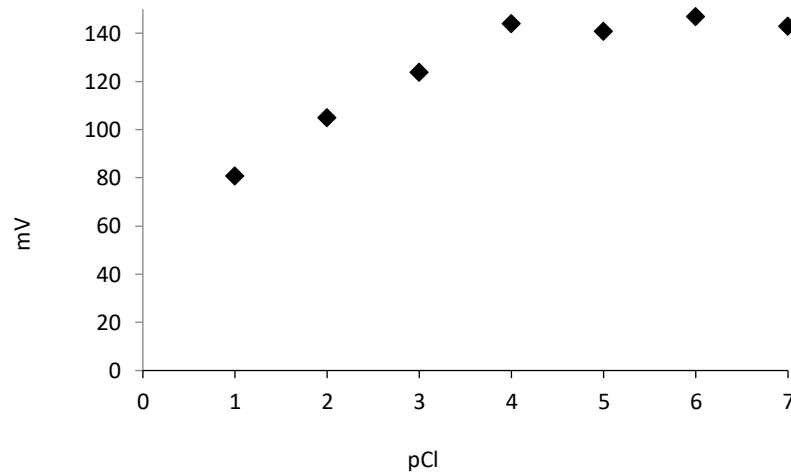
- 3.3.5.1. Sensibilidad ante iones Cl<sup>-</sup>

Para realizar la determinación de cloruros en disolución, primero se determinó la sensibilidad de detección del ion cloruro que tiene el electrodo. Para ello se registraron los potenciales de siete diferentes disoluciones de NaCl cuyas concentraciones fueron de 0.1 F hasta 10<sup>-7</sup> F (Tabla 36).

Tabla 36. Potencial obtenido para siete disoluciones de NaCl con concentraciones de  $|Cl^-|$  en el intervalo de 0.1 M hasta  $10^{-7}$  M.

Concentración	pCl	E (mV)
0.1	1	81
0.01	2	105
0.001	3	124
0.0001	4	144
0.00001	5	141
0.000001	6	147
0.0000001	7	143

A continuación, se muestra la gráfica 82 con el potencial registrado para las distintas disoluciones de NaCl.



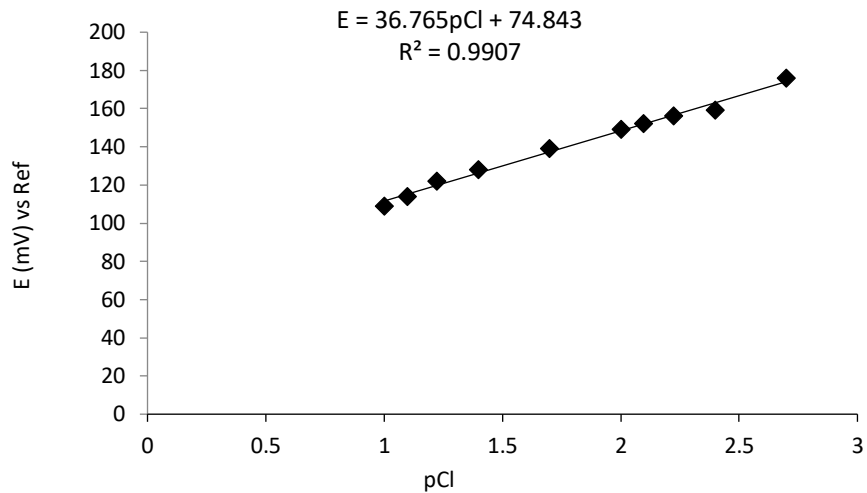
Gráfica 82: Potencial registrado para diferentes disoluciones de NaCl con concentraciones de 0.1 M, 0.01 M, 0.001 M, 0.0001M, 0.00001 M, 0.000001 M y 0.0000001 M

En la gráfica 82 se puede observar un comportamiento lineal hasta que se presenta un cambio en la pendiente a una concentración de  $10^{-4}$  M, por tanto, los datos adquiridos utilizando el electrodo tendrán validez hasta esta concentración.

Para verificar la linealidad de los datos adquiridos se realizó un ensayo con diez disoluciones de distintas concentraciones que oscilan de 0.1 M hasta  $2 \times 10^{-3}$  M, cuyos resultados se presentan en la tabla 37 y en la gráfica 83.

Tabla 37. Potencial obtenido para diez disoluciones de NaCl con concentraciones de  $\text{Cl}^-$  en el intervalo de 0.1 M hasta  $2 \times 10^{-3}$  M.

<i>Concentración</i>	<i>pCl</i>	<i>E (mV)</i>
0.1	1	109
0.08	1.0969	114
0.06	1.2218	122
0.04	1.3979	128
0.02	1.6990	139
0.01	2	149
0.008	2.0969	152
0.006	2.2218	156
0.004	2.3979	159
0.002	2.6990	176



*Gráfica 83: Curva de calibración del electrodo.  
Potencial registrado para diferentes concentraciones de Cl<sup>-</sup> 0.1 M, 0.08 M, 0.06 M, 0.04 M, 0.02 M, 0.01 M, 0.008 M, 0.006 M, 0.004 M y 0.002 M.*

En la gráfica se puede observar un buen coeficiente de correlación lineal, por tanto, se puede trabajar adecuadamente en este intervalo de concentraciones.

○ 3.3.5.2. Titulación Argentométrica.

Para estos ensayos se colocaron 60  $\mu$ L de NaCl 0.01 F en trece diferentes pozos de la placa de microtitulación y se adicionaron 20  $\mu$ L de AgNO<sub>3</sub> 0.01 F desde el segundo pozo de manera acumulativa hasta tener un volumen

total de 300  $\mu\text{L}$ . El proceso anterior se repitió para cada ensayo, dando como resultado los siguientes datos (tabla 38 y gráficas de la 84 a la 90 que están en el anexo).

*Tabla 38. Datos obtenidos en los ensayos de la titulación de 60  $\mu\text{L}$  de NaCl 0.1 F con  $\text{AgNO}_3$  0.1 F.*

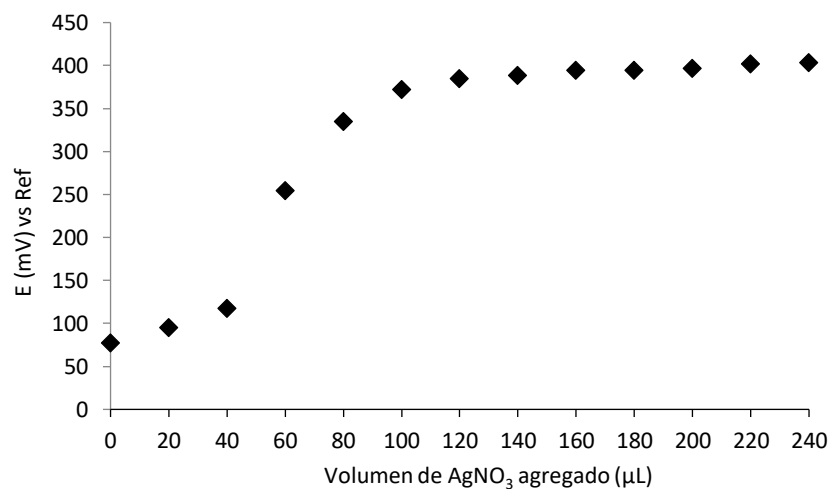
Volumen agregado de $\text{AgNO}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	Número de ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
0	74	70	88	71	72	71	93
20	89	82	104	99	105	81	105
40	108	104	125	115	125	112	133
60	185	178	276	339	325	181	299
80	310	337	342	346	331	325	353
100	353	361	375	395	402	352	369
120	365	364	383	424	431	359	369
140	375	373	384	415	432	365	375
160	376	375	388	435	441	367	378
180	374	379	389	429	443	364	381
200	381	384	380	443	453	352	382
220	387	384	392	444	459	362	386
240	387	385	393	448	459	364	388

A continuación, se calculó el promedio de los potenciales determinados y los resultados se muestran en la tabla 39 y en la gráfica 91.



Tabla 39. Promedio de E de los datos obtenidos en los ensayos de la titulación de 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCl}$  0.1 F con  $\text{AgNO}_3$  0.1 F (ER  $[\text{Ag}/\text{AgCl}_{(s)}, \text{KNO}_3$  (Sat.)] con ET  $\text{Ag}_2\text{O}_{(s)}/\text{Ag}_{(s)}$ ).

Volumen agregado de $\text{AgNO}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	Promedio de los potenciales determinados en los ensayos (mV)
0	77
20	95
40	117.4286
60	254.7143
80	334.8571
100	372.4286
120	385
140	388.4286
160	394.2857
180	394.1429
200	396.4286
220	402
240	403.4286



Gráfica 89: Promedio de E de los ensayos para la titulación argentométrica.

La curva de titulación por precipitación de  $\text{AgCl}_{(s)}$  sigue el cambio de concentración de iones  $\text{Cl}^-$  como una función del volumen agregado de  $\text{AgNO}_3$ , resultando en una curva que tiene un punto de equivalencia muy cercano a los  $60 \mu\text{L}$ .

La curva de titulación responde a los iones  $\text{Cl}^-$  como la ecuación de Nernst predice.

- *3.3.5. Conclusiones parciales.*

Se observó que la lectura del electrodo no es estable en el tiempo, pero permite diferenciar entre las concentraciones de cloruro.

La detección de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se logró adecuadamente con los ISE utilizados.

Es posible correlacionar linealmente los valores obtenidos de potencial en un ensayo con una escala de pH o pCl para las disoluciones en estudio.

Se demuestra que se pueden realizar titulaciones potenciométricas con los ISE utilizados para los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-$  con volúmenes de  $300 \mu\text{L}$ .

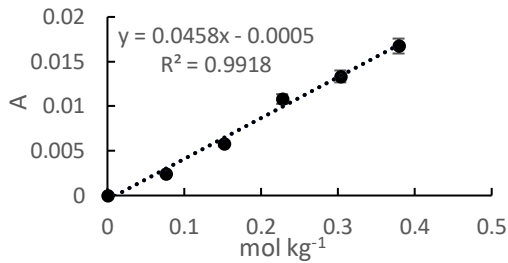
## Capítulo IV/Discusión y conclusiones.

En los experimentos descritos se trabajaron disoluciones de analitos que son de interés común en distintas áreas para determinar su concentración. Se comprobó que utilizando materiales de bajo costo y de adquisición local se pueden llevar a cabo análisis ópticos, voltamperométricos y potenciométricos con resultados aceptables para diferentes analitos. También se demostró la posibilidad de utilizar la placa de microtitulación para realizar múltiples ensayos colocando todas las disoluciones de estudio en los pozos de la placa y realizar los ensayos en serie. Además, la placa de microtitulación tiene como ventajas la disminución en el riesgo de manipulación, la menor generación de residuos, la posibilidad de poder utilizarse para la docencia en zonas con escasos recursos económicos y en la disminución del costo de cualquier análisis debido a un decremento de volúmenes de las muestras y de los reactivos.

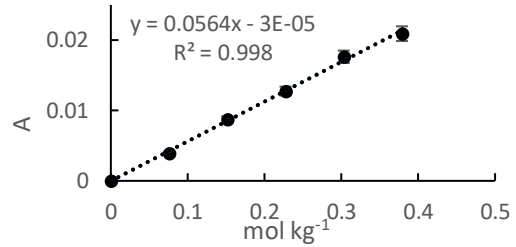
## Capítulo V/ Anexo.

Resultados de los ensayos usando las disoluciones de cobre amoniaco.

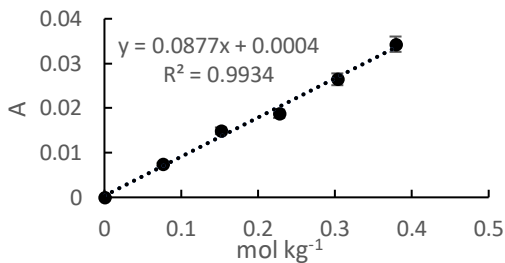
Gráficas de la 1 a la 10 obtenidas en los ensayos usando las disoluciones de cobre amoniaco.



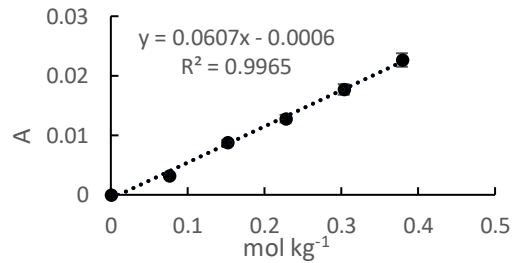
Gráfica 1: Curva de calibración del ensayo 1 con complejo cobre amoniaco.



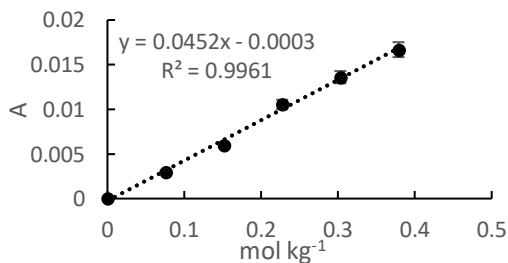
Gráfica 6: Curva de calibración del ensayo 6 con complejo cobre amoniaco.



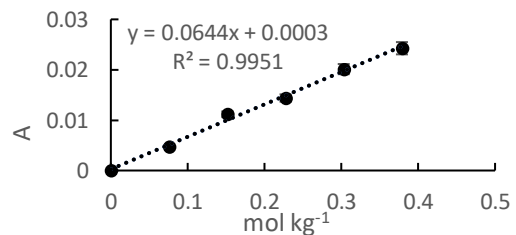
Gráfica 2: Curva de calibración del ensayo 2 con complejo cobre amoniaco.



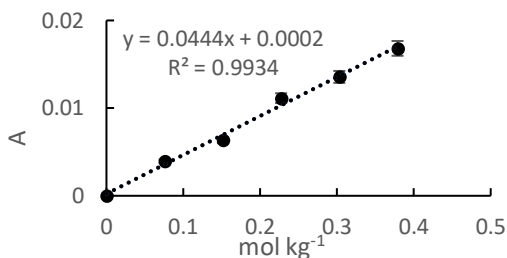
Gráfica 7: Curva de calibración del ensayo 7 con complejo cobre amoniaco.



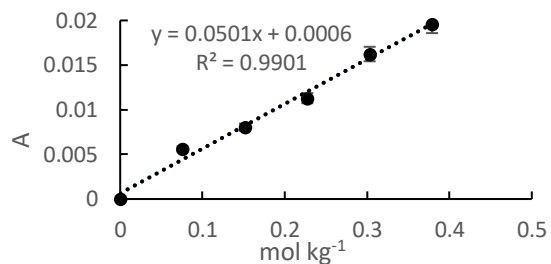
Gráfica 3: Curva de calibración del ensayo 3 con complejo cobre amoniaco.



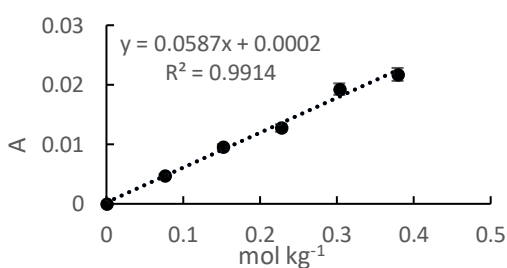
Gráfica 8: Curva de calibración del ensayo 8 con complejo cobre amoniaco.



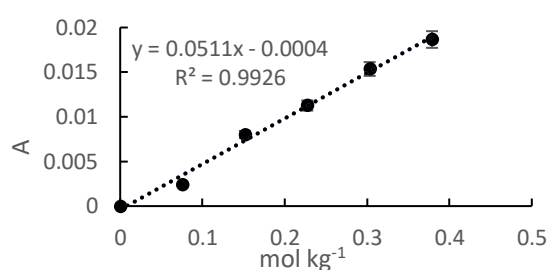
Gráfica 4: Curva de calibración del ensayo 4 con complejo cobre amoniaco.



Gráfica 9: Curva de calibración del ensayo 9 con complejo cobre amoniaco.



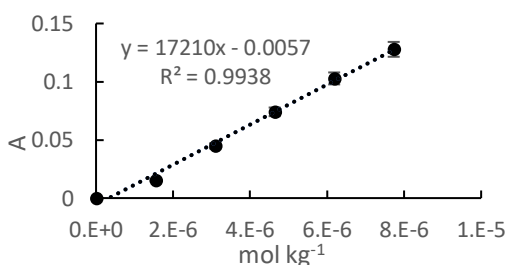
Gráfica 5: Curva de calibración del ensayo 5 con complejo cobre amoniaco.



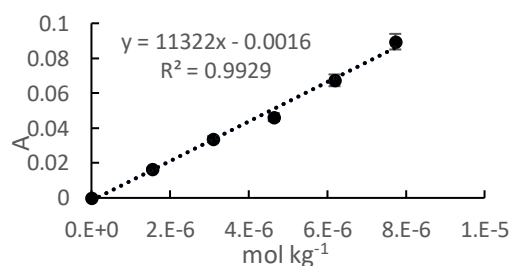
Gráfica 10: Curva de calibración del ensayo 10 con complejo cobre amoniaco.

Resultados de los ensayos usando el reactivo de Biuret.

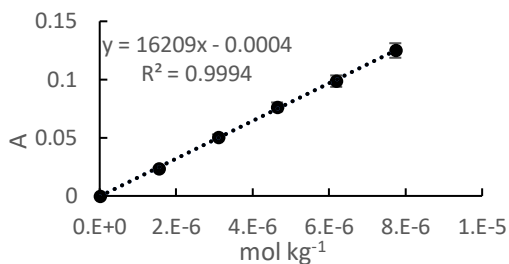
Gráficas de la 12 a la 21 obtenidas en los ensayos usando el reactivo de Biuret.



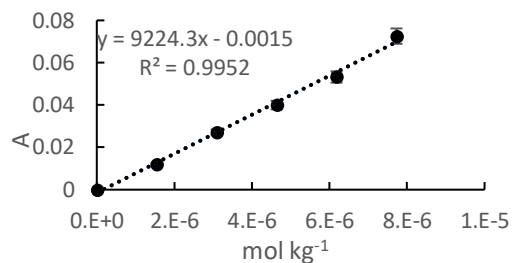
Gráfica 12: Curva de calibración para el ensayo 1 del reactivo de Biuret.



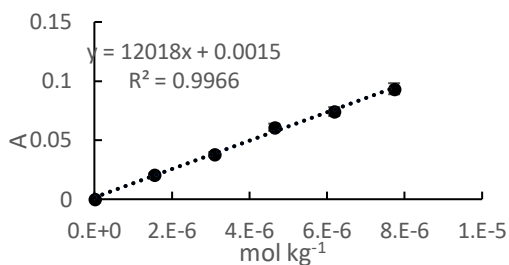
Gráfica 17: Curva de calibración para el ensayo 6 del reactivo de Biuret.



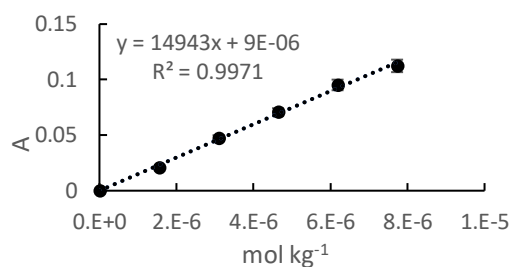
Gráfica 13: Curva de calibración para el ensayo 2 del reactivo de Biuret.



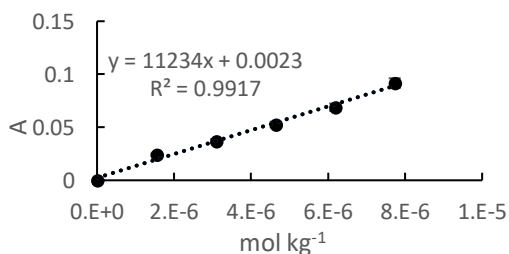
Gráfica 18: Curva de calibración para el ensayo 7 del reactivo de Biuret.



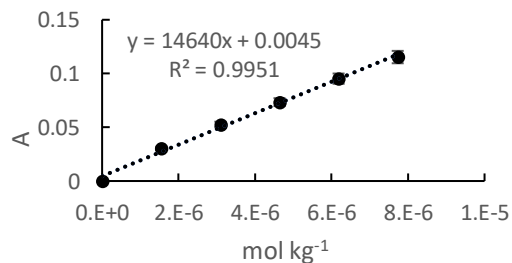
Gráfica 14: Curva de calibración para el ensayo 3 del reactivo de Biuret.



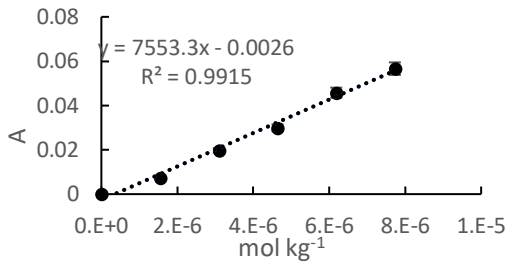
Gráfica 19: Curva de calibración para el ensayo 8 del reactivo de Biuret.



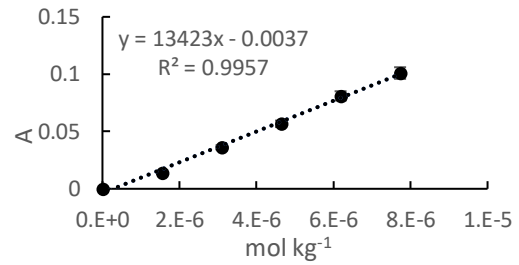
Gráfica 15: Curva de calibración para el ensayo 4 del reactivo de Biuret.



Gráfica 20: Curva de calibración para el ensayo 9 del reactivo de Biuret.



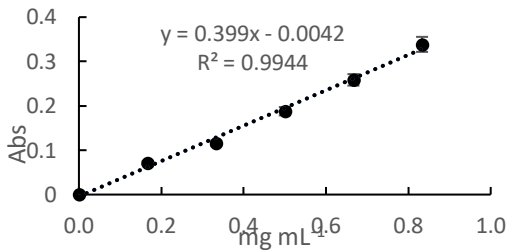
Gráfica 16: Curva de calibración para el ensayo 5 del reactivo de Biuret.



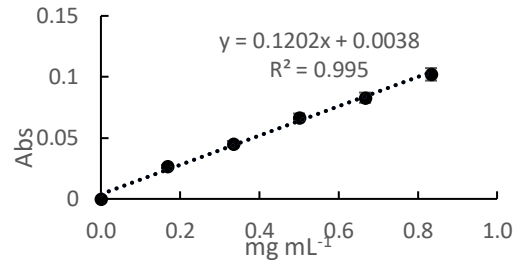
Gráfica 21: Curva de calibración para el ensayo 10 del reactivo de Biuret.

Resultados de los ensayos usando el reactivo de Drabkin.

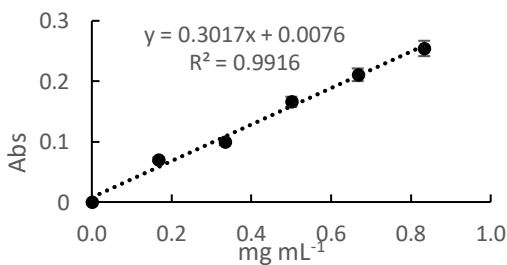
Gráficas de la 23 a la 32 obtenidas en los ensayos usando el reactivo de Drabkin.



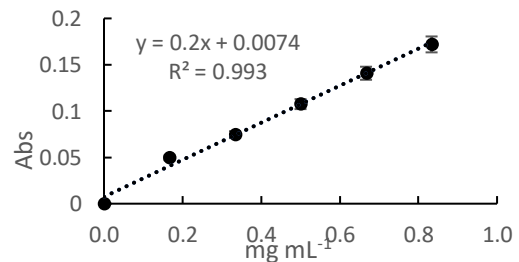
Gráfica 23: Curva de calibración para el ensayo 1 del reactivo de Drabkin.



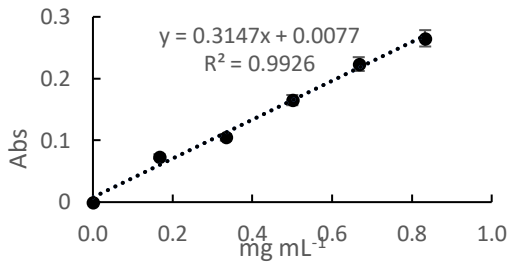
Gráfica 28: Curva de calibración para el ensayo 6 del reactivo de Drabkin.



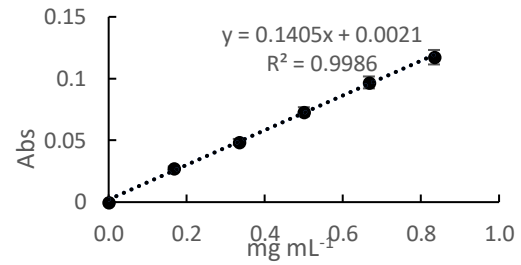
Gráfica 24: Curva de calibración para el ensayo 2 del reactivo de Drabkin.



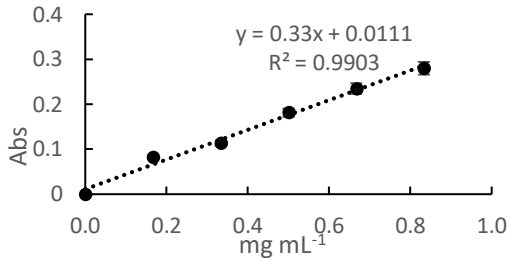
Gráfica 29: Curva de calibración para el ensayo 7 del reactivo de Drabkin.



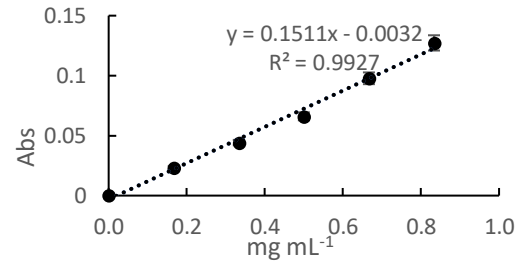
Gráfica 25: Curva de calibración para el ensayo 3 del reactivo de Drabkin.



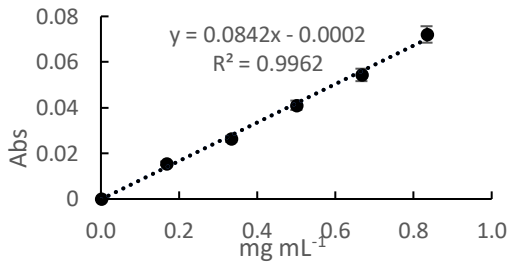
Gráfica 30: Curva de calibración para el ensayo 8 del reactivo de Drabkin.



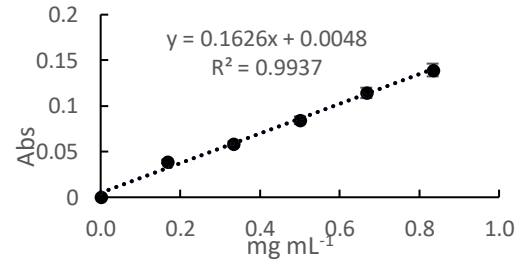
Gráfica 26: Curva de calibración para el ensayo 4 del reactivo de Drabkin.



Gráfica 31: Curva de calibración para el ensayo 9 del reactivo de Drabkin.



Gráfica 27: Curva de calibración para el ensayo 5 del reactivo de Drabkin.

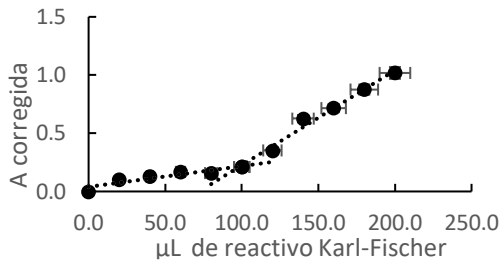


Gráfica 32: Curva de calibración para el ensayo 10 del reactivo de Drabkin.

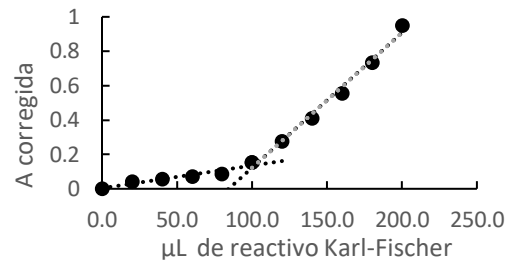
Resultados de los ensayos usando el reactivo de Karl-Fischer.

Gráficas de la 34 a la 43 obtenidas en los ensayos usando el reactivo de Karl-Fischer.

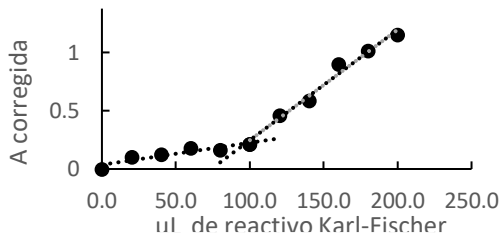




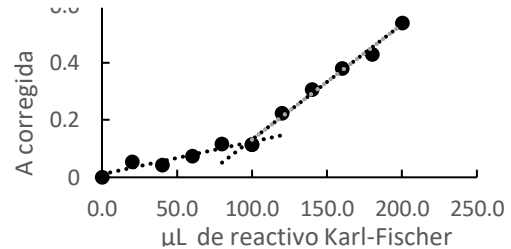
Gráfica 34: Curva de calibración para el ensayo 1 del reactivo de Karl-Fisher.



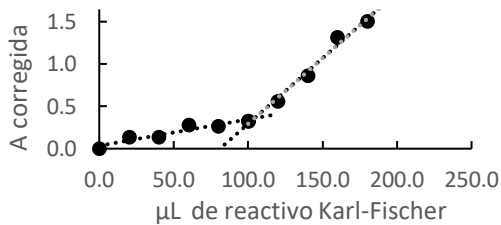
Gráfica 39: Curva de calibración para el ensayo 6 del reactivo de Karl-Fisher.



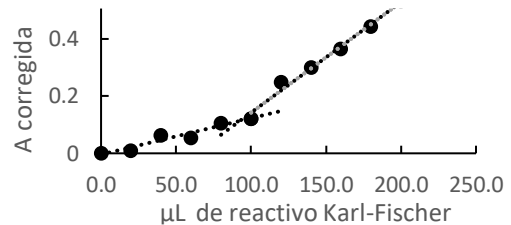
Gráfica 35: Curva de calibración para el ensayo 2 del reactivo de Karl-Fisher.



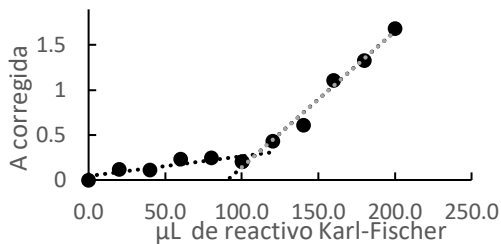
Gráfica 40: Curva de calibración para el ensayo 7 del reactivo de Karl-Fisher.



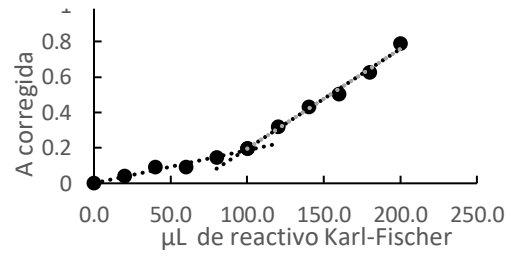
Gráfica 36: Curva de calibración para el ensayo 3 del reactivo de Karl-Fisher.



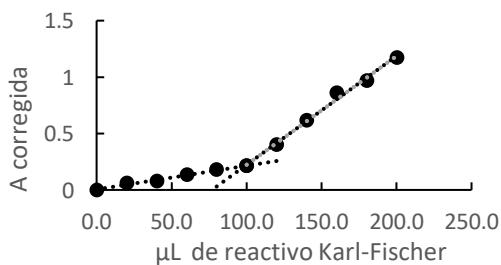
Gráfica 41: Curva de calibración para el ensayo 8 del reactivo de Karl-Fisher.



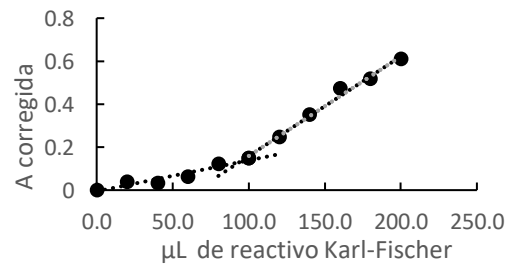
Gráfica 37: Curva de calibración para el ensayo 4 del reactivo de Karl-Fisher.



Gráfica 42: Curva de calibración para el ensayo 9 del reactivo de Karl-Fisher.



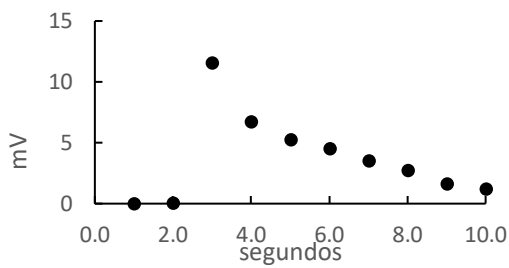
Gráfica 38: Curva de calibración para el ensayo 5 del reactivo de Karl-Fisher.



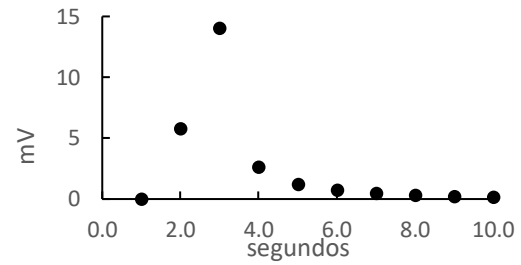
Gráfica 43: Curva de calibración para el ensayo 10 del reactivo de Karl-Fisher.

Resultados de los ensayos usando Luminol.

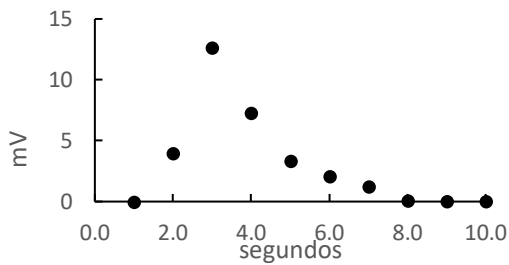
Gráficas de la 44 a la 48 obtenidas en los ensayos usando luminol.



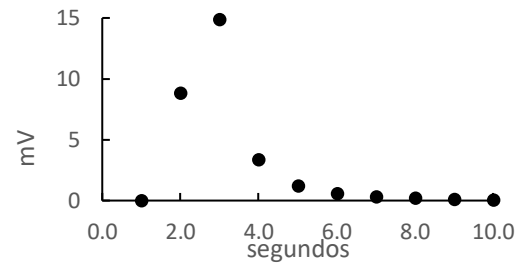
*Gráfica 44: Resultados del ensayo 1 usando luminol*



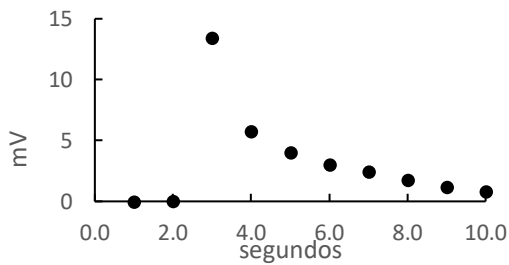
*Gráfica 47: Resultados del ensayo 4 usando luminol*



*Gráfica 45: Resultados del ensayo 2 usando luminol*



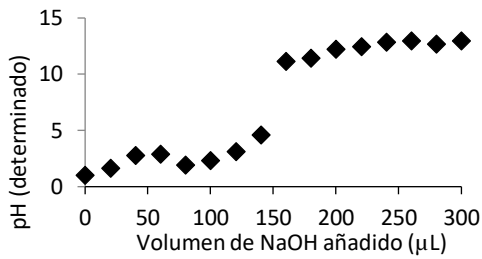
*Gráfica 48: Resultados del ensayo 5 usando luminol*



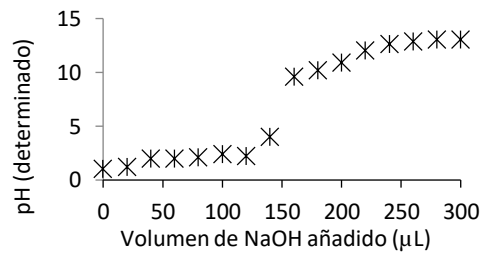
*Gráfica 46: Resultados del ensayo 3 usando luminol*

Ensayos de la titulación HCl con NaOH.

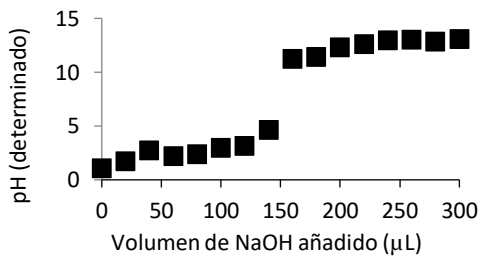
Gráficas de la 58 a la 64 obtenidas en los ensayos de la titulación para el sistema HCl - NaOH con HCl 0.1 F y NaOH 0.1 F.



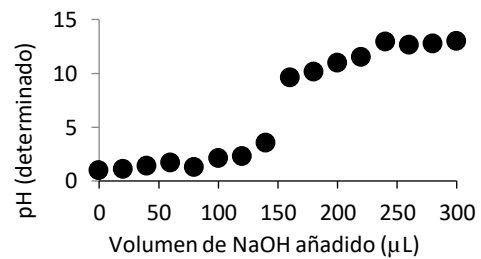
Gráfica 58: Resultados del ensayo 1 para el sistema HCl-NaOH.



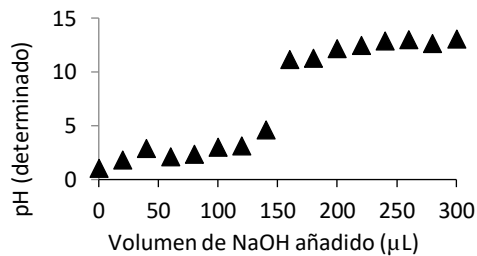
Gráfica 62: Resultados del ensayo 5 para el sistema HCl-NaOH.



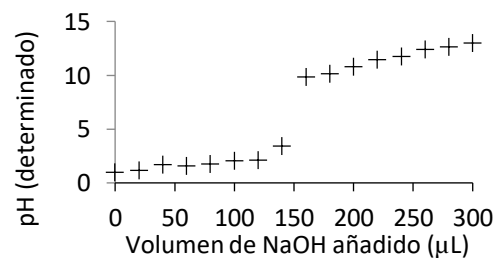
Gráfica 59: Resultados del ensayo 2 para el sistema HCl-NaOH.



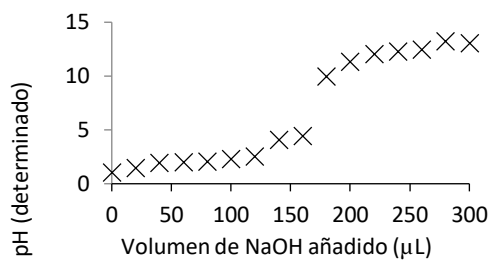
Gráfica 63: Resultados del ensayo 6 para el sistema HCl-NaOH.



Gráfica 60: Resultados del ensayo 3 para el sistema HCl-NaOH.



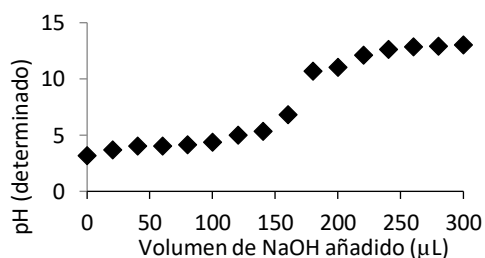
Gráfica 64: Resultados del ensayo 7 para el sistema HCl-NaOH.



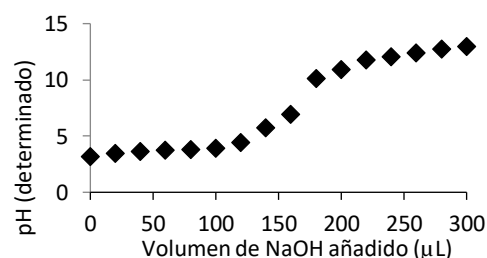
Gráfica 61: Resultados del ensayo 4 para el sistema HCl-NaOH.

Ensayos de la titulación de biftalato de potasio con NaOH.

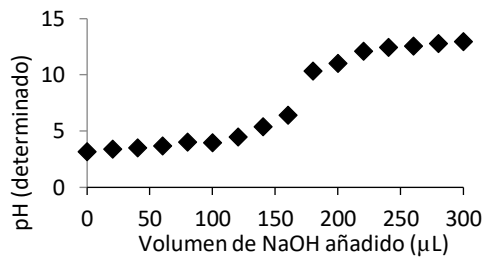
Gráficas de la 66 a la 72 obtenidas en los ensayos de la titulación para el sistema biftalato de potasio - NaOH con *biftalato de potasio* 0.1 F y NaOH 0.1 F.



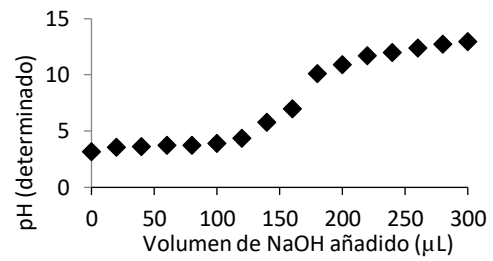
Gráfica 66: Resultados del ensayo 1 para el sistema biftalato de potasio-NaOH



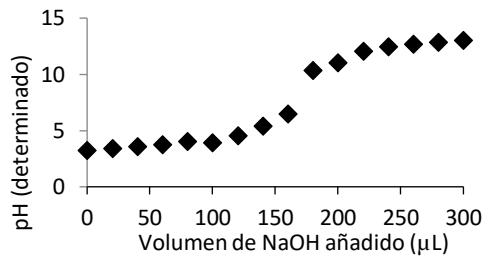
Gráfica 70: Resultados del ensayo 5 para el sistema biftalato de potasio-NaOH



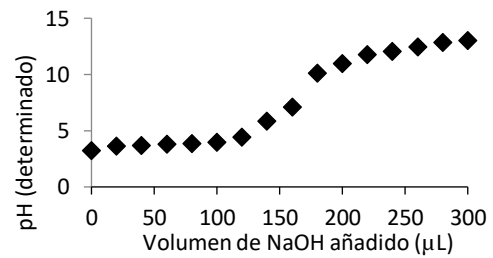
Gráfica 67: Resultados del ensayo 2 para el sistema biftalato de potasio-NaOH



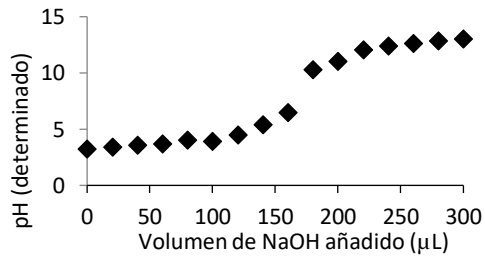
Gráfica 71: Resultados del ensayo 6 para el sistema biftalato de potasio-NaOH



Gráfica 68: Resultados del ensayo 3 para el sistema biftalato de potasio-NaOH



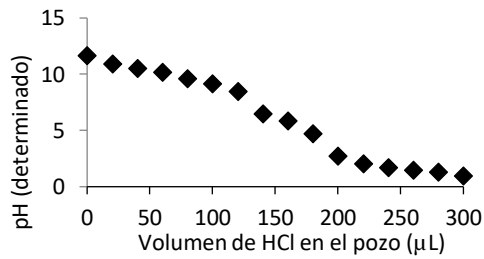
Gráfica 72: Resultados del ensayo 7 para el sistema biftalato de potasio-NaOH



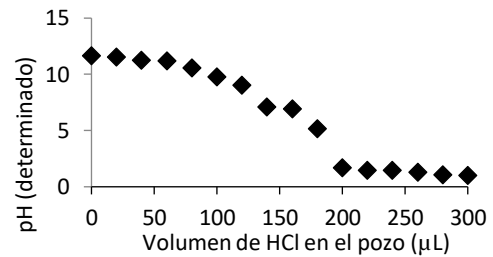
Gráfica 69: Resultados del ensayo 4 para el sistema biftalato de potasio-NaOH

## Ensayos de la titulación de HCl con $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

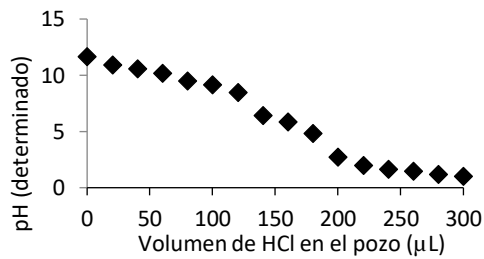
Gráficas de la 74 a la 80 obtenidas en los ensayos de la titulación para el sistema HCl-  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con HCl 0.1 F y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 F.



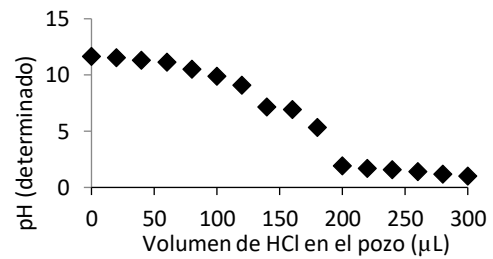
*Gráfica 74: Resultados del ensayo 1 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$*



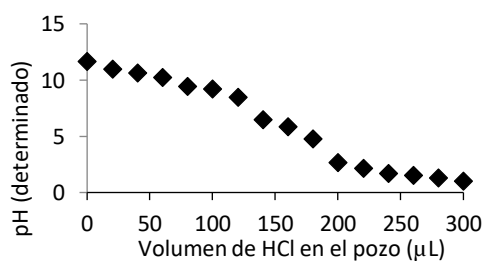
*Gráfica 78: Resultados del ensayo 5 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$*



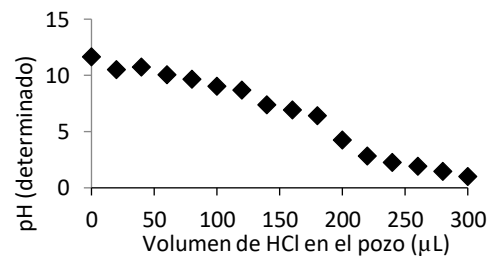
*Gráfica 75: Resultados del ensayo 2 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$*



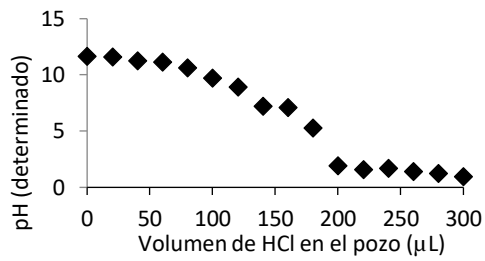
*Gráfica 79: Resultados del ensayo 6 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$*



*Gráfica 76: Resultados del ensayo 3 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$*



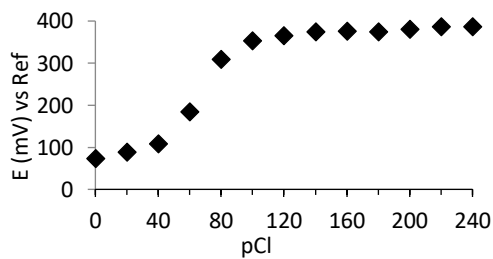
*Gráfica 80: Resultados del ensayo 7 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$*



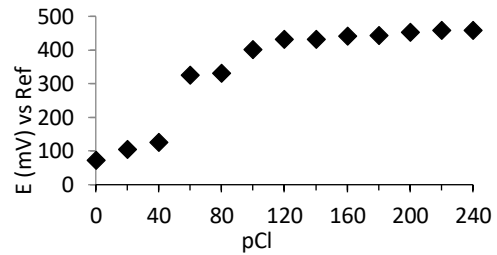
Gráfica 77: Resultados del ensayo 4 para el sistema HCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$

### Titulación Argentométrica

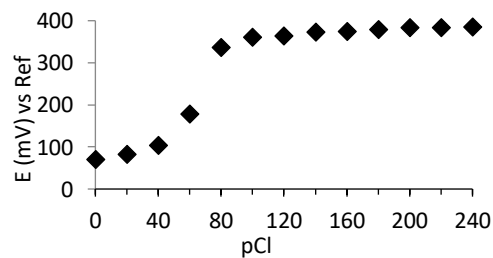
Gráficas de la 84 a la 90 obtenidas en los ensayos de la titulación de 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCl}$  0.1 F con  $\text{AgNO}_3$  0.1 F.



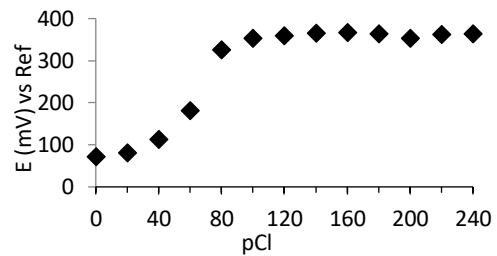
Gráfica 84: Resultados del ensayo 1 para la titulación de  $\text{NaCl}$  con  $\text{AgNO}_3$



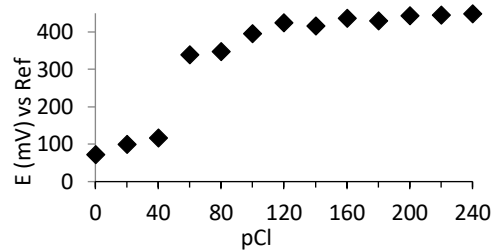
Gráfica 88: Resultados del ensayo 5 para la titulación de  $\text{NaCl}$  con  $\text{AgNO}_3$



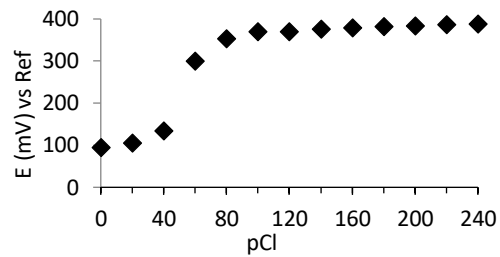
Gráfica 85: Resultados del ensayo 2 para la titulación de  $\text{NaCl}$  con  $\text{AgNO}_3$



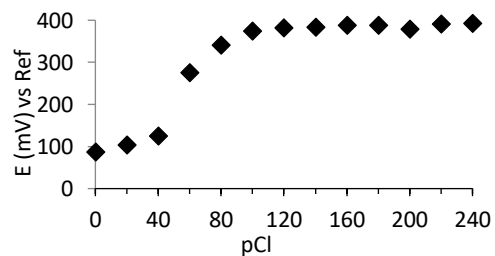
Gráfica 89: Resultados del ensayo 6 para la titulación de  $\text{NaCl}$  con  $\text{AgNO}_3$



Gráfica 86: Resultados del ensayo 3 para la titulación de NaCl con AgNO<sub>3</sub>



Gráfica 90: Resultados del ensayo 7 para la titulación de NaCl con AgNO<sub>3</sub>



Gráfica 87: Resultados del ensayo 4 para la titulación de NaCl con AgNO<sub>3</sub>



## Capítulo VI/ Bibliografía.

Muhammad Akhtar, Hernandez E. V. , Baeza Reyes A., Qazi A. M. y Escobar R. N. (2003). The use of  $W^0$  micro biosensor to measure the site-specific pH changes in the rhizosphere of lupinus silvestris fertilized with different sources of P. *Pakistan Journal of Soil Science*, 22(2), 41–46.

Alejandro Baeza, Adrián de Santiago, Eduardo Galicia, J. Manuel Martínez (2005). *Total Microscale Analytical Chemistry: Instrumental Analysis Experimental Teaching International Microscale Chemistry Symposium*. 1–4. Retrieved from [http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/Articulo\\_MicroAnalytical\\_Chemistry\\_2161.pdf](http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/Articulo_MicroAnalytical_Chemistry_2161.pdf)

Baeza A. (2003). Titulaciones Ácido-Base: Potenciometricas a Microescala Total con Microsensores de pH y de referencia de bajo costo. *Revista de Chile En Educación Científica*, 1(2), 16–19. Retrieved from <http://www.oocities.org/mx/electroquimika/papers/paperchile-2-difinitivo2k3baeza.pdf>

Baeza A. (2015). *Sensores y Biosensores Electroquímicos*. Citado de:

<http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2018/08/Sensores-y-biosensores-Electroquímicos.pdf>

Baeza Reyes A. (2006). Química Analítica a Microescala Total. *La Ciencia*

*Más Allá Del Aula*, 1–9. Citado de:

[http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/Documento\\_de\\_apoyo-QUIMICA\\_ANALITICA\\_MICROESCALA\\_TOTAL\\_2172.pdf](http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/Documento_de_apoyo-QUIMICA_ANALITICA_MICROESCALA_TOTAL_2172.pdf)

Baeza Reyes A. (2007). Determinación del pT por medición

microfotométrica de bajo costo. Citado de:

[http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/PresentacionCLASE-\\_LEY\\_BEER\\_Microfotocolorimetria\\_22181.pdf](http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/PresentacionCLASE-_LEY_BEER_Microfotocolorimetria_22181.pdf)

Baeza Reyes A., & García Mendoza A. (2011). *Principios de*

*Electroquímica Analítica*.

C. Harris Daniel (2007). Quantitative Chemical Analysis. In *Methods in*

*Geochemistry and Geophysics* (Séptima ed, Vol. 5).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-40826-6.50009-1>

- Dauer Chacón C., y Santillán Martínez G. (2011). *Sistema para electrodepósito químico de metales basado en un circuito potenciostato programable*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Eugen Scholz (2012). *Karl Fisher Titration: Determination of Water*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo 1984.
- García Mendoza A., Marín Medina A. y Baeza A. (2014). *Microscale electroanalytical chemistry experimental teaching with locally produced low-cost instrumentation 65th Annual ISE*. 1. Citado de [http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/PAPER\\_ISE\\_LAUSANNE\\_2014\\_29679.pdf](http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/PAPER_ISE_LAUSANNE_2014_29679.pdf)
- García Mendoza A., Santiago Zárate A. y Baeza Reyes A. (2017). Descripción y aplicación de la ley de Lambert-Beer-Bouger para la determinación de etanol en tequila, empleando instrumentación construida con materiales de bajo costo y adquisición local. *Anuario Latinoamericano de Educación Química (ALDEQ) Número 32*, 13–16.
- Gary D. Christian (2009). *Química analítica* (Sexta edic; P. E. R. V. Rodríguez, Ana L. Delgado, Ed.). México: Mc Graw Hill.

Hădărugă Nicoleta G., Hădărugă Ioan D. y Isengard Heinz D. (2013).  
"surface water" and "strong-bonded water" in cyclodextrins: A Karl  
Fischer titration approach. *Journal of Inclusion Phenomena and  
Macrocyclic Chemistry*, 75(3-4), 297-302.  
<https://doi.org/10.1007/s10847-012-0143-7>

Khanfar M. F., Al-Faqheri W. y Al-Halhouli A. (2017). Low cost lab on  
chip for the colorimetric detection of nitrate in mineral water  
products. *Sensors (Switzerland)*, 17(10).  
<https://doi.org/10.3390/s17102345>

Martínez Juan M. y Baeza A. (2004). Química Microanalítica:  
Determinación de ácido acetilsalicílico con Microfotocolorímetros de  
Mínima Instrumentación (MIMC) de bajo costo. *Revista Cubana de  
Química*, 16(3), 29-39.

Neelima Rajvaidya, Dilip Kumar Markandey (2006). Microbiology. APH  
Publishing corporation, 290.

O'Toole M. y Diamond D. (2008). Absorbance based light emitting diode  
optical sensors and sensing devices. *Sensors*, 8(4), 2453-2479.  
<https://doi.org/10.3390/s8042453>

Olvera García F. J., García Zendoza A., Santiago Zárata A. y Baeza A. (2016). Micropotenciometría Analítica: Captura de datos con smartphones y video apps empleando instrumentación construida con materiales de bajo costo y adquisición local. *Anuario Latinoamericano de Educación Química (ALDEQ)*, (número 32), 86–89.

Oscar William Schalm, Nemi Chand Jain, (1986). Schalm's Veterinary Hematology. Lea & Febiger, 44.

Owen T. (1996). *Fundamentals of modern uv-visible spectroscopy: A primer*.

Petcavich R. J. (2017). *Patent No. WO 2017/034954 A1*.  
<https://doi.org/10.1007/S10544-011-9588-5>

Serna Ruiz A., García Ros F. A. y Noguera Rico C. J. (2010). Guía Práctica de Sensores. In *Guía Práctica de Sensores* (p. 226). España: Creaciones Copyright, S.L.

Skoog D. A., Holler F. J. y Crouch S. R. (2008). *Principios de análisis fundamental*.

Sorouraddin M. H. y Saadati M. (2010). Determination of copper in urine and water samples using a simple led-based colorimeter. *Journal of Analytical Chemistry*, 65(4), 423–428.  
<https://doi.org/10.1134/s1061934810040143>

Sorouraddin M. H., Saadati M. y Samadi A. (2010). A simple and cheap device for colorimetric determination of serum iron. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 57(1), 56–61.

<https://doi.org/10.1002/jccs.201000009>

Stoica B. A., Bunescu S., Neamtu A., Bulgaru Iliescu D., Foia L. y Botnariu E. G. (2016). Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *Journal of Forensic Sciences*, 61(5), 1331–1336.

<https://doi.org/10.1111/1556-4029.13141>

Valdez Aragón S. (2004). Química en microescala. *Educación Química*, 17(2), 184–186.

Vilaso J. E., Arada M. A., Baeza A. y Cespedes A. (2016). Construction and Metrological Characterization of a Minimal Instrumentation Micropolarograph. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 34(5), 309–320.

<https://doi.org/10.4152/pea.201605309>