

67  
203



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



**"DETERMINACION INDIRECTA DE NICOTINA Y DE ATROPINA  
POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
HERIBERTO SANCHEZ JIMENEZ

ASESOR: DR. JOSE LUIS JURADO BAIZAVAL

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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.

## INDICE

1. <u>INTRODUCCION.</u>	1
1.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.	1
1.2. INSTRUMENTACION PARA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.	2
1.2.1. SISTEMA DE UN SOLO HAZ CONTINUO.	2
1.2.2. SISTEMA DE UN SOLO HAZ INTERMITENTE.	2
1.2.3. SISTEMA DE DOBLE HAZ DE CORRIENTE ALTERNA.	3
1.2.4. LAMPARAS.	3
1.2.5. NEBULIZADOR.	4
1.2.6. QUEMADORES.	4
1.3. EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO.	5
1.3.1. FASE ORGANICA INMISCIBLE.	6
1.3.2. FASE ACUOSA.	7
1.3.3. CONDICIONES TECNICAS.	7
1.3.4. DISOLVENTES.	8
1.3.4. EXTRACCION DE DIVERSAS ESPECIES.	8
1.4. DETERMINACIONES INDIRECTAS POR E.A.A.	10
1.5. CARACTERISITCAS DE LOS ALCALOIDES EN ESTUDIO.	12
1.5.1. NICOTINA.	12
1.5.2. TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA.	13

1.5.3. ATROPINA.	14
1.5.4. TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE ATROPINA.	15
<u>2. OBJETIVOS.</u>	17
<u>3. MATERIALES Y METODOS.</u>	18
3.1. APARATOS Y REACTIVOS.	18
3.2. PREPARACION Y VALORACION DE DISOLUCIONES.	19
3.2.1. DISOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA.	19
3.2.2. DISOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE ATROPINA.	21
3.3. METODOLOGIA.	23
3.3.1. DETERMINACION DE NICOTINA.	23
3.3.1.1. Extracción de nicotina.	23
3.3.1.2. Valoración de nicotina.	23
3.3.1.3. Determinación de nicotina por espectrofotometría de absorción atómica.	24
3.3.2. DETERMINACION DE ATROPINA.	27
3.3.2.1. Determinación de atropina por espectrofotometría de absorción atómica.	27
3.3.2.2. Estudio de las condiciones óptimas para la extracción de atropina.	28
3.3.2.3. Curva de calibración de atropina con cobalto.	29
3.3.2.4. Determinación de sulfato de atropina por espectrofotometría visible ultravioleta.	30

4. <u>ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.</u>	31
4.1. DETERMINACION DE NICOTINA.	31
4.1.1. VALORACION POTENCIOMETRICA.	31
4.1.1.1. Determinación de la cantidad mínima detectable.	32
4.1.1.2. Determinación del por ciento en peso para diferentes tipos de tabaco.	34
4.1.2. DETERMINACION POR ABSORCION ATOMICA.	34
4.1.2.1. Determinación con cobre.	34
4.1.2.2. Determinación con zinc.	37
4.2. DETERMINACION DE ATROPINA.	40
4.2.1. DETERMINACION POR ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE-ULTRAVIOLETA.	40
4.2.2. DETERMINACION POR ABSORCION ATOMICA.	41
4.2.2.1. Influencia de los factores que afectan en la extracción.	41
4.2.2.2. Condiciones experimentales optimas.	45
4.2.2.3. Curva de calibración de atropina con cobalto.	45
4.3. RESUMEN DE RESULTADOS.	47
4.3.1. DETERMINACION DE NICOTINA.	47
4.3.2. DETERMINACION DE ATROPINA.	48
5. <u>CONCLUSIONES.</u>	49
5.1. NICOTINA.	49
5.2. ATROPINA.	50
6. <u>FIGURAS.</u>	51
7. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	59

## 1. INTRODUCCION.

### 1.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

La Espectrofotometría de Absorción Atómica (E.A.A.). Es un método para la detección y cuantificación particularmente de elementos metálicos.

Para determinar un elemento por absorción atómica, se debe vaporizar y reducir a su estado atómico. Un rayo luminoso de longitudes de onda características es emitido por una lámpara especial, y dirigido a través del eje longitudinal de una flama hacia un monocromador. Al mismo tiempo la disolución de la muestra, dispersa en forma de niebla, pasa a la flama donde el vapor de la sal se disocia produciendo los átomos del elemento en estudio, los cuales absorben parte de la luz emitida por la lámpara, Esta absorción se mide y se relaciona con la concentración del elemento.

Cada elemento absorbe luz a longitudes de onda características que se pueden utilizar para su identificación y cuantificación. Estas longitudes de onda características se conocen como líneas de resonancia del elemento, pues son las capaces de excitar el átomo.

La cantidad de radiación absorbida por átomos neutros en su estado basal siguen la ley de Beer. Como el coeficiente de absorptividad (E) y la longitud de la celda (b) en este caso la flama son constantes, la absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración (C):

$$A = C E b$$

Los gases en la flama son considerados como un medio que contiene átomos libres y no excitados y que son capaces de absorber radiación de una fuente externa. Si la radiación corresponde a la energía requerida para dar lugar a una transición del elemento en estudio, éste pasará de un estado electrónico normal basal a un estado de mayor excitación.

La radiación que no es absorbida pasa entonces a través del monocromador que separa la línea espectral excitada de la fuente de

luz y es enviada hacia el fotodetector.

La absorción de radiación de la fuente de luz depende de la población de átomos en el estado basal y la cual va a ser proporcional a la concentración de la solución problema, rociada en la flama.

La absorción se mide por medio de la diferencia entre las señales transmitidas en presencia y ausencia del elemento analizado.

La ley de Beer sólo se aplica a radiación monocromática, ningún monocromador ordinario puede dar una banda de radiación tan estrecha como el ancho de pico que se requiere para una línea de absorción atómica. Este problema se supera usando una fuente de radiación que emita una línea de resonancia de la misma longitud de onda que la que se emplea para el análisis.

La principal desventaja de la técnica es la necesidad de una fuente de radiación distinta para cada elemento que se analiza. Para evitar esto se puede usar una fuente de radiación continua con un monocromador de muy alta resolución, no obstante, es más conveniente usar lámparas individuales.

## 1.2. INSTRUMENTACION PARA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

### 1.2.1. SISTEMA DE UN SOLO HAZ CONTINUO.

La radiación que proviene de la flama y de la fuente (lámpara) es continua y genera una corriente directa en el detector. Esta radiación proveniente del cátodo hueco pasa a través de la flama y la línea de resonancia de interés se separa en el monocromador y pasa al detector.

Este sistema presenta la desventaja de tener interferencias producidas por la flama y las variaciones de intensidad de la fuente de radiación las cuales no se pueden eliminar fácilmente.

### 1.2.2. SISTEMA DE UN SOLO HAZ INTERMITENTE.

La luz de la fuente se hace intermitente por medio de un obturador giratorio (la luz de la flama permanece sin alterarse) y se produce una corriente alterna en el detector que proviene de la

fuentes de radiación. Con esto se eliminan las interferencias producidas por la flama.

Este sistema presenta el inconveniente de tener una variación en la intensidad de la radiación por variaciones normales en la temperatura de la lámpara durante el análisis

#### 1.2.3. SISTEMA DE DOBLE HAZ DE CORRIENTE ALTERNA.

Aquí el obturador giratorio es un disco que contiene sectores reflejantes, lo cuál rompe la continuidad del haz luminoso proveniente de la lámpara, produciendo dos rayos intermitentes o pulsantes, uno sirve de referencia y el otro atraviesa la flama donde se lleva a cabo la absorción, dando origen a una señal en el detector producida por la relación de dos rayos intermitentes.

Con esto se evitan las interferencias producidas por la radiación continua de la flama o de las variaciones provenientes de la fuente.

#### 1.2.4. LAMPARAS.

##### 1.2.4.1. Lámpara de cátodo hueco.

Es la más comunmente usada en absorción atómica. Tanto cátodo hueco como ánodo se encuentran montados en el interior de un bulbo de vidrio. El cátodo esta formado por el elemento en estudio o por una aleación de éste, el ánodo es de tungsteno, níquel o zirconio, elementos reductores que evitan la oxidación del cátodo alargando la vida de la lámpara.

La ventana, puede ser de vidrio o sílice fundida, depende de la longitud de onda de la radiación con la que se va a trabajar, el bulbo contiene argón o neón a baja presión, estos gases emiten espectros de líneas muy finas.

##### 1.2.4.2. Lámpara de descarga sin electrodo.

En este tipo de lámparas se hace incidir una radiación de frecuencia adecuada que excita al elemento de interés. La diferencia

operacional de éstas con respecto a las de cátodo hueco, es que en las primeras se regula la potencia de la radiación aplicada y en las segundas se regula la intensidad de corriente entre ánodo y cátodo hueco.

Estas lámparas han revestido una gran importancia, puesto que se les ha podido construir para elementos que no se pueden analizar con las de cátodo hueco, tal es el caso del fósforo.

#### 1.2.5. NEBULIZADOR.

El propósito del nebulizador o atomizador es el de introducir la muestra a la flama a una velocidad constante y convertida en una fina niebla de tamaño de gota uniforme.

Este dispositivo debe ser fácil de limpiar, resistente a la corrosión y de ajuste sencillo. Dependiendo de la región óptima de la flama que se vaya a usar, el ajuste adecuado del nebulizador varía para diferentes elementos, por lo que es aconsejable efectuar éste ajuste para cada elemento que se vá analizar.

#### 1.2.6. QUEMADORES.

##### 1.2.6.1. De consumo total, flujo turbulento o inyección directa.

En estos quemadores, la muestra es aspirada por una boquilla de venturi y dirigida directamente sobre la flama, donde se consume en su totalidad. El tamaño de gota no es uniforme; su diámetro promedio es de 20  $\mu\text{m}$ . Las gotas más grandes pasan a través de la flama sin ser evaporadas por completo, lo cual da lugar a interreferencias químicas (teniéndose una eficiencia muy pobre).

##### 1.2.6.2. Quemador de premezclado o flujo laminar.

En este quemador, la muestra se mezcla con el combustible y el oxidante (en una cámara de mezclado antes de ser quemado), el tamaño promedio de las gotas es de 10  $\mu\text{m}$ .

Con este quemador existe el peligro de explosión en la cámara. Esto se evita usando un quemador de ranuras angostas, 0.3 mm para

aire-acetileno-óxido nítrico y de 0.5 mm para aire-acetileno.

Los productos de combustión y el calor son extraídos por una campana sobre el quemador.

### 1.3. EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO.

Un proceso de distribución líquido-líquido. Se basa en la transferencia de una o más sustancias entre dos fases líquidas inmiscibles puestas en contacto. También se le denomina como partición líquido-líquido.

El fundamento de la técnica es la diferencia de solubilidad de los solutos entre dos fases y las fuerzas puestas en juego se basan en procesos de partición, los cuales comprenden equilibrios de distribución a los que se pueden aplicar relaciones termodinámicas. En cuanto a modo operatorio se pueden desarrollar mediante las técnicas simple y continua ó repetitiva.

TABLA 1. ASPECTOS GENERALES DE LA EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.

<u>1. Fase orgánica inmiscible:</u>		
- Extractante.	- Stripping.	- Diluyente.
- Scrubbing.	- Modificador.	
<u>2. Fase acuosa:</u>		
- Composición.	- pH.	
- Presencia de ligandos enmascarantes.		
- Presencia de agentes enmascarantes.		
<u>3. Condiciones técnicas:</u>		
- Relación de fases.	- Agitación	
- Separación de fases.	(Duración e intensidad).	
- Temperatura.		

### 1.3.1. FASE ORGANICA INMISCIBLE.

#### a) Extractante.

De acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC. Normalmente se trata de un líquido orgánico inmiscible con el agua que tiene carácter no disociante e inerte (que no realiza solvólisis). En él se disuelven fácilmente sustancias orgánicas no ionizadas, especies inorgánicas neutras, pares iónicos, quelatos metálicos etc.

El agente extractante es la sustancia activa de la fase orgánica responsable de la transferencia del soluto de la fase acuosa. Realiza la formación del quelato, la solvatación y la formación de aductos para la extracción. Si la fase orgánica tiene una sola composición el disolvente inmiscible es quién realiza todo lo anterior.

#### b) Diluyente.

Líquido orgánico inmiscible que contiene el agente extractante y que generalmente tiene papel inerte en la extracción, mejora las propiedades extractivas (selectividad); los hidrocarburos alifáticos y aromáticos se usan mucho con estos fines.

#### c) Modificador.

Sustancia disuelta en la fase orgánica que mejora sus propiedades:

- Mejora solubilidad del agente extractante.
- Mejora propiedades interfaciales (Agentes surfactantes).
- Ejerce efecto sinérgico en la extracción.

#### d) Stripping (reextracción).

Consiste en realizar una nueva distribución entre el extracto y una nueva fase acuosa de tal manera que la sustancia de interés pase a ésta.

#### e) Scrubbing (lavado).

Limpieza en un proceso de extracción entre el extracto o re-extracto y una nueva fase acuosa u orgánica, permitiendo separar las impurezas que acompañan a la sustancia de interés.

### 1.3.2. FASE ACUOSA.

#### a) Composición.

Además del soluto o mezcla de solutos a separar, contiene ácidos o bases inorgánicas, a veces, sustancias orgánicas que proceden de:

I. Tratamiento previo, al cual ha sido sometida la muestra (generalmente en la disolución). Por lo tanto deben de conocerse las operaciones realizadas y tipo de muestra.

II. Adición de sustancias para favorecer la extracción de un determinado soluto o para impedir la extracción de otros.

#### b) pH.

El pH de la disolución acuosa es muy importante, por lo que debe especificarse. En caso de zona de gran acidez o gran basicidad, es preciso fijar su concentración usando generalmente un ácido o base fuertes (HCl ó NaOH). El pH es de especial importancia en la extracción de quelatos metálicos.

#### c) Ligandos.

Los ligandos presentes pueden ser agentes complejantes o enmascarantes, su concentración debe fijarse con exactitud. Debe tenerse en cuenta la formación de complejos con ligandos que se introducen a la muestra y cuya presencia es decisiva en el proceso de separación de cationes y aniones.

#### d) Agentes salinos.

Son compuestos totalmente disociados cuyo objetivo es el de estabilizar las especies neutras en solución acuosa. Se recomienda el uso de sales como; KCl, KClO<sub>4</sub>, NaClO<sub>4</sub> y KNO<sub>3</sub>.

### 1.3.3. CONDICIONES TECNICAS.

#### a) Agitación.

La agitación aumenta la interfase durante la separación, su duración puede variar entre amplios límites. Generalmente, se consideran 30 segundos como un tiempo adecuado para conseguir un equilibrio de distribución.

#### b) Separación de fases.

Debe evitarse la formación de emulsiones que hace tediosa la separación. Una técnica de extracción es recomendable cuando en menos de 1 ó 2 minutos se logra la interfase plana y definida entre las fases.

#### c) Temperatura.

Es un factor a considerarse, aunque las técnicas de extracción no se modifican sustancialmente entre 18 y 38° C., margen normal de temperatura ambiente en un laboratorio.

### 1.3.4. DISOLVENTES.

Características de un disolvente orgánico para su empleo en un proceso de extracción líquido-líquido:

- a) Baja solubilidad y reactividad con el agua.
- b) Punto de ebullición no debe ser excesivamente bajo.
- c) Moderada presión de vapor y viscosidad.
- d) Densidad adecuada para originar correcta separación de fases.
- e) Baja tendencia a formar emulsiones y alta estabilidad química.

### 1.3.4. EXTRACCION DE DIVERSAS ESPECIES.

#### 1.3.4.1. Quelatos metálicos.

Los métodos de separación basados en técnicas de extracción de quelatos metálicos constituyen un amplio campo en la Química Analítica, pues proporcionan la posibilidad de llevar a cabo separaciones extremadamente selectivas.

Los quelatos neutros ( $ML_2$ ) son aquéllos complejos en los que las cargas del ion metálico se compensan con las del ligando. Normalmente estos quelatos son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos inmiscibles en ésta.

La cuantitatividad de la extracción se encuentra en función de

una serie de variables experimentales:

- a) pH.
- b) Concentración de ligando.
- c) Carácter ácido/base del ligando.
- d) Disolvente.

Existe un buen número de ejemplos representativos de la extracción de quelatos metálicos (Valcárcel, 1984) [26], que hacen de este método uno de los más aplicados.

#### 1.3.4.2. Especies covalentes.

Las moléculas con carácter marcadamente covalente se extraen de las disoluciones acuosas usando tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) ó hidrocarburos alifáticos u aromáticos como disolventes.

#### 1.3.4.3. Especies iónicas.

Cuando los 4 átomos de hidrógeno del ion amonio son sustituidos por hidrocarburos, el compuesto de amonio cuaternario se convierte en un electrolito fuerte. Se utiliza para la extracción de aniones y complejos aniónicos metálicos, por formación de par iónico. Estos compuestos de amonio cuaternario, se utilizan como extractantes de aniones incluso a partir de disoluciones alcalinas, ésta es otra manera de incrementar la extracción del metal por formación de un par iónico.

El uso del par iónico en química analítica es muy extenso y ampliamente desarrollado debido a la acción de combinación que permite con otras técnicas analíticas como: métodos redox, espectrofotometrías, precipitación de sales y formación de un quelato extraíble o complejo de asociación.

El uso de complejos metálicos, permite la determinación indirecta de compuestos orgánicos por espectrofotometría de absorción atómica. Este tipo de asociaciones se forman entre complejos metálicos cargados y la especie orgánica, con carga de signo opuesto.

Para especies orgánicas cargadas negativamente, los complejos con carga positiva -de cobre y de hierro- tienen un uso muy extenso. Para

las cargadas positivamente, los complejos con carga negativa -de cromo, zinc y cobalto-, son muy utilizados.

#### 1.4. DETERMINACIONES INDIRECTAS POR E.A.A.

El uso de complejos metálicos permite la determinación indirecta de compuestos orgánicos por espectrofotometría de absorción atómica, como por ejemplo:

##### a) Acido ascórbico.

Su determinación se basa en la reducción de los iones cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ó plata ( $\text{Ag}^+$ ) a iones  $\text{Cu}^+$  ó  $\text{Ag}^0$  (metálica), respectivamente. Una muestra de ácido ascórbico se hace reaccionar con una disolución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y tiocianato de potasio ( $\text{KSCN}$ ), el  $\text{Cu}^+$  se precipita como tiocianato, lo mismo que la plata. Para ambos casos el precipitado se filtra, los filtrados son diluidos y se mide la absorbancia de cobre o plata a 324.7 ó 338.3 nm respectivamente (Al-zamil, 1982) [01].

##### b) $\alpha$ -aminoácidos.

Una disolución de  $\alpha$ -aminoácidos se hace reaccionar con una disolución que contiene: cloruro de cobre dihidratado ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), en fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Se agita para completar la reacción y se filtra determinando el cobre por absorción atómica en el filtrado, (Minami, 1983) [13].

##### c) Antimalarios (derivados de la quinolina).

Se determinan por formación de complejos ternarios. El cobalto reacciona con los iones tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) y el antimalario, para formar el complejo ternario que se extrae fácilmente con nitrobenceno. Como la disolución se torna azul-verdosa, el cobalto del complejo se puede determinar también por espectrofotometría visible a 625 nm. Por absorción atómica se determina el cobalto en el extracto orgánico de nitrobenceno. (Hassan, 1982) [08].

d) Acido barbitúrico y derivados.

Se prepara una solución en metanol del derivado de ácido barbitúrico que se esté estudiando y a una alícuota se le adiciona reactivo de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) disuelto en metanol (MeOH) y dietilenamina de concentración conocida. Después de 30 minutos de reacción se filtra y en el filtrado se determina por absorción atómica el cobre que queda sin reaccionar (Minami, 1982) [14].

e) Pilocarpina.

Método de microdeterminación para el alcaloide pilocarpina. El procedimiento se basa en la medición del mercurio contenido en el complejo con pilocarpina. El alcaloide es precipitado por adición de un exceso conocido de reactivo de Mayer; solución estándar de yoduro potásico mercuríco de 1 a 10 ppm de  $\text{Hg}^{2+}$ . Se centrifuga y se separa el sobrenadante donde se determina el mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) residual por absorción atómica (Ayad, 1986) [03].

f) Anestésicos locales.

Para la determinación de anestésicos locales como: lidocaína, tetracaína y procaína, se utilizan iones cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) llevando a cabo una reacción de precipitación del anestésico, posteriormente, se filtra y se determina el cobalto residual en el filtrado; el método se aplica en el análisis de anestésicos locales en preparaciones farmacéuticas (Montero, 1988) [15].

g) Alcaloides.

Un nuevo procedimiento para la determinación de alcaloides se basa en el uso del reactivo de Dragendorff; solución de yoduro potásico bismútico, que consiste en la extracción del par iónico, entre la base orgánica y el complejo inorgánico de  $\text{BiI}_4^-$ . Posteriormente, se determina el bismuto (Bi) en la fase orgánica.

Por éste método se pueden determinar los siguientes alcaloides: Difenhidramina, Papaverina, Amilocaína, Bromohexina, Esparteína y Avacán. Este método permite la determinación de mezclas binarias de alcaloides, sin que se presenten interferencias por los excipientes cuando se analizan preparaciones farmacéuticas. (Nerin, 1986) [17].

#### h) Determinaciones con otros elementos.

Cadmio ( $Cd^{2+}$ ).— Se usa para la determinación de penicilinas (Kidani, 1975). [16]

Cobre ( $Cu^{2+}$ ).— En la determinación de Histamina (Sakai, 1982) [18], para insecticidas como el malatión (Hernández, 1985) [09] y surfactantes aniónicos y no iónicos (Gallegos, Grasso, 1986) [05, 06].

Hierro ( $Fe^{2+}$ ).— Para la determinación de compuestos como pentaclorofenol y ácido salicílico (Yamamoto, 1969) [16].

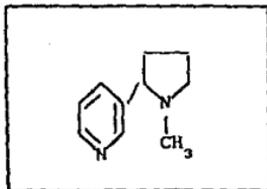
Manganeso ( $Mn^{2+}$ ).— Usado en la determinación de azúcares como lactosa y glucosa (Issa, 1985, 1986) [09].

Níquel ( $Ni^{2+}$ ).— Para la determinación de ácido 2-hidroxinaftoico en agua (Yamamoto, 1969) [16].

### 1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS ALCALOIDES EN ESTUDIO.

#### 1.5.1. NICOTINA.

La determinación cuantitativa de los alcaloides del tabaco, ha sido de gran interés científico. El alcaloide nicotina se obtiene de la Nicotiana tabacum (Solanácea), su contenido en hojas de tabaco varía entre 1 y 8 %.



Nicotina.

3-(1-metil-2-pirrodilil)piridina.

$C_{10}H_{14}N_2$  P.M.: 162.23

En alto grado de pureza, es un líquido aceitoso, incoloro o de color amarillo pálido, altamente higroscópico. Con exposición al aire y a la luz se torna de color café, debido a la oxidación.

Densidad 1.01g/ml, punto de ebullición 247 °C. con descomposición. índice de refracción 1.5280, sabor quemante cáustico y

olor a piridina. soluble en agua, metanol, cloroformo, benceno y éter. constantes de disociación pKas 3.2 y 7.9 (25° C.).

En el cuerpo humano, la nicotina se absorbe por el tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y piel. Su distribución es extensiva a todos los tejidos, se metaboliza por oxidación a cotinina y N-1-óxido de nicotina, la degradación continúa hasta hidroxicotinina y nornicotina. Cerca del 5 % se excreta por orina en 24 hrs. y cerca del 10% es cotinina.

La nicotina es altamente tóxica y muy venenosa, puede provocar muerte en pocos minutos, afecta el sistema respiratorio produciendo parálisis de los músculos respiratorios. La dosis letal en adulto es de 40 a 60 mg. Una concentración en sangre de 5 µg/ml puede ser fatal. La máxima concentración atmosférica permisible es de 0.5mg/m<sup>3</sup>. Su toxicidad tiene aplicación en el control de insectos.

#### 1.5.2. TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA.

##### a). Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Se dispone de numerosos métodos para la estimación de nicotina. Se han desarrollado técnicas como la CLAR, que permite una cuantificación de cantidades muy pequeñas de los alcaloides del tabaco, el procedimiento permite la extracción de nicotina de tejidos y su separación.

El método es capaz de detectar cantidades por debajo de los 2 a 5 picogramos de nicotina, utilizando una columna de fase reversa de C<sub>18</sub>, con una fase móvil de metanol al 40%, conteniendo 0.2% de buffer de fosfatos a pH de 7.25 con trietanolamina (Saunders, 1981) [19].

##### b). Cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de gases se ha adaptado para la determinación de nicotina usando un detector específico de nitrógeno, con esto es posible analizar nicotina en aire, aguas y plasma sanguíneo. Usando una columna de vidrio de 6 ft (pies) de longitud rellena con Chromosorb malla 80 - 100, cubierto con 10% de apiezon-L conteniendo 3% de KOH. Condiciones del equipo, temperatura de columna 190 °C., inyector y detector de 250 °C. (Grubnez, 1980) [07].

c). Otros métodos analíticos.

Gravimetría (Chattaway, 1929) [02]. Cromatografía de gases-espectroscopía de masas (Dowand, 1978) [02]. Potenciometría (Efstathiou, 1981) [04]. Polarografía (Moskatore, 1980) [02].

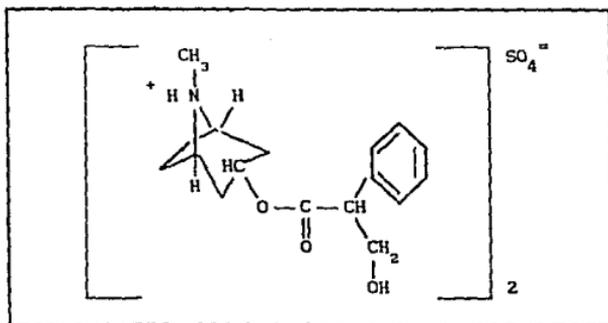
Espectrofotometría ultravioleta (máxima absorbancia: en medio ácido 259 nm. En medio alcalino 261 nm). Infrarrojo (Principales picos del espectro, longitud de onda: 712, 1022, 810, 1575, 1310, 1040), en capa delgada (Clarke's, 1986) [21].

d). Espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

La determinación de nicotina por espectrofotometría de absorción atómica se propone como un método alternativo simple y preciso, el cual no se había usado antes para la determinación de este alcaloide. Se basa en la precipitación del alcaloide con Cu, Pb, Zn ó Hg y la subsecuente medición del metal equivalente contenido en el precipitado y el contenido en el filtrado (Ayad, 1985) [02].

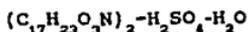
1.5.3. ATROPINA.

Es un alcaloide que se obtiene de la Duboisia spp., y de otras plantas Solanáceas o bien preparada por síntesis orgánica, se puede obtener como sulfato de atropina.



Sulfato de Atropina.

Acido bencenacético alfa-(hidroximetil)-,8-metil-8-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il ester, sulfato(2:1), monohidrato



P.M.: 694.8

Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, con punto de fusión de 190 °C. con descomposición, soluble en agua y etanol, insoluble en cloroformo y éter, su constante de disociación es  $pK_a = 9.9$  (20° C.).

Este alcaloide se absorbe por membranas mucosas, piel y tracto gastrointestinal pero no por estómago, cerca del 80 al 90 % de la droga se excreta por orina en 24 hrs. El 50% de la droga no es metabolizada (no se altera). Menos del 2% se metaboliza a ácido trópicico y cerca del 30% a metabolitos desconocidos. La dosis letal para adultos va de 50 a 100 mg. y una dosis de 10 mg para niños es letal. Tiene uso terapéutico como anticolinérgico.

#### 1.5.4. TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE ATROPINA.

##### a). Cromatografía.

Cromatografía en capa fina (Reveladores: Dragendorff; positivo. Solución de Iodoplatino; positivo. Reactivo de Marquiz; positivo rosa). Cromatografía de gases (CG). Cromatografía de líquidos de alta resolución. (CLAR). (Clarke's, 1986) [21].

##### b). Espectrofotometría.

Ultravioleta (dos máximos de absorbancia en medio ácido a 252 y 258 nm). Infrarrojo (Principales picos del espectro, longitud de onda: 1720, 1035, 1153, 1163, 1063, 1204) en pastilla de KBr.

##### c). Otros métodos analíticos.

Espectroscopía de masas (Principales picos del espectro, a m/z: 124, 82, 94, 83, 42, 96, 103, 67). (Clarkes, 1986) [21]. Polarografía (Kalvoda, 1982) [12].

##### d). Espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

Como ya se indicó, el uso de los pares iónicos tiene una gran aplicación en química analítica, debido a que el uso de iones de complejos metálicos permite la determinación indirecta de productos orgánicos por espectrofotometría de absorción atómica.

Los complejos formados entre el ion tiocianato ( $SCN^-$ ) que es un anión, con varios cationes, son la base de la determinación indirecta

de compuestos orgánicos, los cationes más usados con tiocianato son: Cromo ( $\text{Cr}^{2+}$ ) y cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ).

En este estudio se usa el cobalto con tiocianato para obtener el complejo inorgánico de  $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$  (tetratiocianato de cobalto II), que se ha usado para la determinación de: Aminas alifáticas, Bromuro de N-butil hiosamina (en preparaciones farmacéuticas) y bromuro de butil escopolamina (presente en orina, sangre y heces) [16].

Este complejo también se ha usado por muchos años en la determinación colorimétrica de alcaloides, pero no por E.A.A.

El complejo de tetratiocianato de cobalto II, es un complejo débil. Se estabiliza por formación de un par de iones con la especie orgánica cargada positivamente.



El par iónico del alcaloide en estudio es ligeramente soluble en agua y totalmente soluble en un disolvente orgánico ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ )

El propósito de una parte de este estudio es iniciar la aplicación del complejo de  $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$  para la determinación de una serie de alcaloides. Una vez que se forma el par iónico alcaloide- $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$ , y se estabiliza en la fase orgánica, se procede a determinar la cantidad de cobalto por absorción atómica, para lo cuál se realiza un estudio de las condiciones óptimas experimentales; pH, concentración de  $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$ , tiempo de agitación, proporción de fase, número de extracciones e intervalo de determinación en una curva de calibración.

Por esta técnica se puede llevar a cabo el estudio y la determinación de alcaloides como; Amilocaína, Papaverina, Esparteína, Procaína, Quinina, Codeína, Atropina, Pilocarpina y Avacan. La fase orgánica utilizada es Cloroformo y 1,2-dicloroetano [16], En este trabajo se realiza el estudio del alcaloide Atropina y su extracción en Cloroformo.

## 2. OBJETIVOS.

- 1). Establecer un método alternativo para la determinación cuantitativa de nicotina y de atropina.
- 2). Establecer las condiciones óptimas de la determinación indirecta de nicotina y de atropina por espectrofotometría de absorción atómica.
- 3). Establecer el intervalo de determinación, límites de detección y repetibilidad de la curva de calibración.

### 3. MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1. APARATOS Y REACTIVOS.

##### I. APARATOS.

- 1). Un espectrofotómetro de absorción atómica Varian techtron, modelo: A.A.6., con un quemador de 10 cm, y flama de aire/acetileno.
- 2). Lámparas de cátodo hueco.
  - a.- Lámpara Varian techtron, para: Manganeso, cobre y cromo, con gas neón, serie: 7K1314.
  - b.- Lámpara Varian techtron para: Hierro, níquel y cobalto, con gas neón, serie 7K1177.
- 3). Un espectrofotómetro: visible - ultravioleta, Beckman, modelo 25.
- 4). Potenciómetro: pH metro Corning, modelo 7. Con electrodos adaptados de: Calomel y vidrio.
- 5). Agitador magnético, Corning, modelo PC-353.
- 6). Balanza analítica, Mettler, modelo H72.

##### II. REACTIVOS.

- 1). Estándar de sulfato de atropina, de pureza conocida: ensayo 95.6 % . Laboratorios Pisa, lote número 0206.
- 2). Extracto de nicotina. Se obtuvo de hojas de tabaco, su pureza se determinó cualitativamente por espectrofotometría de infrarrojo y ultravioleta, cuantitativamente por potenciometría.

3). Reactivos sólidos:

- Biftalato de potasio (Baker analyzed).
- Celita (Merck).
- Cloruro de cobalto hexahidratado (Monterrey).
- Hidróxido de bario (Baker analyzed).
- Hidróxido de sodio (Baker analyzed).
- Nitrato de cobalto hexahidratado (merck).
- Perclorato de potasio (Baker analyzed).
- Sulfato de cobre pentahidratado (Baker analyzed).
- Sulfato de sodio anhidro (Baker analyzed).
- Sulfato de zinc heptahidratado (Baker analyzed).
- Tiocianato de amonio (Baker analyzed).

4). Reactivos líquidos:

- Acido acético glacial (Merck).
- Acido clorhídrico (Merck).
- Acido perclórico (Baker analyzed).
- Anhídrido acético (Baker analyzed).

5). Disolventes:

- Benceno (Baker analyzed).
- Cloroformo (Merck).

### 3.2. PREPARACION Y VALORACION DE DISOLUCIONES.

#### 3.2.1. DISOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA.

##### 3.2.1.1. Preparación de una solución de ácido perclórico aproximadamente 0.1 M.

Se miden, con una pipeta graduada, 8.5 ml de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 72 %, y se transfieren a un vaso de precipitados de 2 litros limpio y seco. Se adicionan 250 ml de ácido acético glacial y 20 ml de anhídrido acético, se agita y se deja reposar la disolución por una hora. Se afora la disolución a un litro con ácido acético glacial y se deja reposar por 24 horas a fin de que se complete la

reacción entre el anhídrido acético y el contenido de agua del ácido perclórico.

### 3.2.1.2. Valoración de la disolución de ácido perclórico 0.1 M.

Se pesan 3 g de Biftalato de potasio macerado (ensayo: 100.02%), en un pesafiltros y se seca en estufa a 110° C. por una hora. Se deja enfriar y se pesan 3 porciones de 0.5 a 0.6 gramos en 3 matraces erlenmeyer limpios, secos y numerados. Se registra el peso de la muestra hasta el valor de 0.1 mg más cercano.

Cada muestra de biftalato de potasio se trata por separado: Se agregan 60 ml de ácido acético glacial, se calienta con cuidado para disolver la sal y posteriormente se deja enfriar. Se llena una bureta con la disolución de ácido perclórico a valorar con cada muestra de Biftalato de potasio, la valoración se sigue potenciométricamente y se determina el punto de equivalencia gráficamente.

Biftalato de potasio muestra en gramos.	ml gastados de ácido perclórico.
1). 0.5483	28.40
2). 0.5532	28.50
3). 0.5478	28.20

Cálculo de la molaridad del ácido perclórico.

$$M. \text{HClO}_4 = \frac{(\text{g de muestra}) (60)}{(0.060) (204.22) (\text{ml de HClO}_4)} \quad (1)$$

Resultados de la molaridad de HClO<sub>4</sub>.

1). 0.094537 M.	$\bar{X} = 0.094901 \text{ M.}$
2). 0.095047 M.	$\text{DSR} = 0.255938 \%$
3). 0.095120 M.	$\mu = 0.094901 \pm 5.32 \times 10^{-4}$

### 3.2.1.3. Preparación de una solución de ácido perclórico: 0.025 M.

Se obtiene por dilución de la solución de ácido perclórico de concentración aproximadamente 0.1 M. En este caso, se midieron 66 ml de la disolución preparada de ácido perclórico 0.094901 M., y se aforó a 250 ml teniendo la siguiente concentración.

$$N_2 = \frac{N_1 V_1}{V_2} = \frac{(0.094901) (66)}{(250)} = 0.025053 \text{ M.} \quad (2)$$

### 3.2.1.4. Preparación de las disoluciones de cobre.

Se preparan a partir de Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  PM: 249.686 g/mol), se pesan 0.393g equivalentes a 0.1g de cobre divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y se afora a 100 ml con agua destilada, obteniéndose la disolución de concentración de 1 mg/ml (1000 ppm). De la disolución anterior se midió una alícuota de 10 ml y aforó a 100 ml con agua destilada, para obtener una disolución con concentración de 100 ppm.

### 3.2.1.5. Preparación de las disoluciones de zinc.

Se pesan 1.0996g de sulfato de zinc [ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ] PM: 287.558 g/mol, equivalentes a 0.25g de zinc divalente ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y se aforan a 250 ml con agua destilada, generándose la disolución de 1 mg/ml (1000 ppm). De esta solución se mide una alícuota de 5 ml y se afora a 100 ml con agua destilada, obteniéndose una concentración de 50 ppm.

## 3.2.2. DISOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE ATROPINA.

### 3.2.2.1. Preparación de una solución de Cobalto de concentración 1 mg/ml.

Se pesan 0.8072 g de cloruro de cobalto [ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ], PM: 237.83 g/mol]. Equivalentes a 0.2 g del cobalto divalente ( $\text{Co}^{2+}$ ) y se aforan a 200 ml con agua destilada, para generar la disolución de 1mg/ml (1000 ppm). De esta disolución se toma una alícuota de 10 ml y se

afora a 100 ml con agua destilada, obteniéndose la disolución de 100 ppm.

### 3.2.2.2. Disolución de tetratiocianato de cobalto.

Se pesan 450 g de tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), 218g de nitrato de cobalto [ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ] y se llevan hasta un volumen de 800 ml con agua destilada, se obtiene entonces la solución reactivo de tetratiocianato de cobalto [ $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$ ]. Obteniéndose una concentración 0.9360 M de cobalto divalente.

### 3.2.2.3. Disolución estándar de sulfato de atropina (1 mg/ml).

Se prepara a partir de un estándar de sulfato de atropina de ensayo: 95.6 %, y disolviendo en agua destilada.

### 3.2.2.4. Disolución de tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), de concentración 0.6395 g/ml.

Se pesan 63.95 g de tiocianato de amonio, se colocan en un vaso de precipitados de 200 ml. Se disuelven en 70 ml de agua destilada, agitando hasta completa disolución y se lleva a 100 ml con agua destilada.

### 3.2.2.5. Disolución de perclorato de potasio ( $\text{KClO}_4$ ), de concentración 0.1385 g/ml.

Se pesan 13.85 g de perclorato de potasio, se transfieren a un vaso de precipitados de 200 ml, se adicionan 70 ml de agua destilada y se agita. Si es necesario se calienta para completar la disolución y posteriormente se afora a 100 ml con agua destilada.

### 3.3. METODOLOGIA.

#### 3.3.1. DETERMINACION DE NICOTINA.

##### 3.3.1.1. Extracción de nicotina.

Se secan 15g de tabaco en una estufa a 70° C. por media hora y se dejan enfriar, se pesan 3g de tabaco seco y se colocan en un matraz erlenmeyer de 250 ml, se adiciona 1g de hidróxido de bario y 40 ml de disolución saturada de hidróxido de bario para empapar el tabaco.

Se adicionan 100 ml de disolución Benceno/Cloroformo (9:1), se tapa y se agita enérgicamente por 20 minutos, se agregan 2g de celita y se agita hasta dispersión total por 5 minutos. Se dejan separar las fases.

Se decanta y filtra la fase orgánica a través de papel filtro Whatman Núm. 2, recibiendo en un matraz erlenmeyer de 125 ml, se adicionan 2g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para secar la fase orgánica. Se deja reposar por 15 minutos, se filtra nuevamente y finalmente se tapa el matraz erlenmeyer para evitar la evaporación.

##### 3.3.1.2. Valoración de nicotina.

Se mide una alícuota de 50 ml y se transfiere a un vaso de precipitado de 250 ml, se valora con una disolución de ácido perclórico 0.025053 M. en ácido acético glacial. La valoración se sigue potenciométricamente, determinando el punto de equivalencia gráficamente y la concentración de nicotina se determina en la fase orgánica en mg/ml y finalmente en porcentaje (%) y en mg/peso de tabaco. Por ejemplo:

Peso de tabaco g.	ml de $\text{HClO}_4$ (0.025053 M.)
1). 3.0906	11.2
2). 3.0397	11.0
3). 3.0516	11.2

a).- Determinación de la concentración en mg/ml de nicotina.

$$\text{Nicotina mg/ml} = \frac{(\text{ml HClO}_4) (\text{M. HClO}_4) (\text{Eq. Quím.})}{(100)} \quad (3)$$

Donde: (Eq. Quím.) equivalente químico = 162.23

Nicotina mg/ml

- 1). 0.4552  $\bar{X}$  = 0.4525 mg/ml de nicotina.  
2). 0.4470 DSR = 0.7984 %.  
3). 0.4552  $\mu$  = 0.4525  $\pm$  7.2969  $\times 10^{-3}$

b).- Determinación de nicotina en mg/peso de tabaco seco.

$$\frac{\text{mg de Nicotina}}{\text{g de Tabaco}} = \frac{(\text{ml HClO}_4) (\text{M. HClO}_4) (\text{Eq. Quím.})}{(\text{Peso de muestra en g})} \quad (4)$$

c).- Determinación de nicotina en % de peso total de tabaco seco.

$$\% \text{ Nicotina} = \frac{(\text{ml HClO}_4) (\text{M. HClO}_4) (\text{Eq. Quím.}) (100)}{(\text{Peso de muestra en g})} \quad (5)$$

3.3.1.3. Determinación de nicotina por espectrofotometría de absorción atómica.

a) Curva de calibración.

Se miden alícuotas de la fase orgánica, conteniendo de 1 a 10 mg de nicotina, y se lleva a cabo la precipitación por adición de un exceso conocido del metal correspondiente.

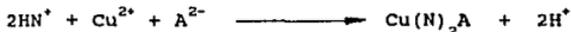
Procedimiento:

1.- Se mide, con pipeta volumétrica, la cantidad necesaria de nicotina contenida en la fase orgánica para cada punto de la curva, y se deposita en matraces erlenmeyer de 125 ml.

2.- Se adiciona a cada matraz 10 ml de agua destilada y se calienta lentamente a una temperatura de 60 a 65 °C, para evaporar la fase orgánica evitando proyecciones, se continúa calentando hasta evaporación total.

3.- Se adiciona una cantidad previamente medida y en exceso del metal correspondiente y se deja completar la reacción de precipitación del complejo nicotina-metal ( $ML_2$ ) por espacio de 20 minutos.

Considerando los valores de pKa de la nicotina (p. 13), que el pH de la disolución es alrededor de 6 y de que se supone una relación molar Cobre-nicotina de 1:2, se puede proponer que el equilibrio de reacción es:



Donde:

N = nicotina  
A = Anión

Este es el equilibrio que parece más probable y, puesto que no es el objetivo de este trabajo el establecerlo, es interesante señalarlo y sugerirlo como tema principal de otro estudio.

4.- Se filtra el precipitado a través de papel filtro Whatman núm. 2. El filtrado se afora a 100 ml con agua destilada (solución A), el precipitado es redisoluto con 10 ml de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M. y se afora a 100 ml con agua destilada (solución B).

5.- Se mide la absorbancia del metal residual y equivalente en las soluciones A y B respectivamente, bajo las condiciones analíticas correspondientes.

b) Curva de calibración de cobre.

De la solución de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) de 100 ppm se miden alícuotas de 1 a 5 ml y se aforan a 50 ml con agua destilada, para obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 ppm de  $Cu^{2+}$ . Se mide la

absorbancia en las siguientes condiciones analíticas para la determinación de cobre, que se determinaron previamente, en base al ya conocido método de la máxima absorbancia.

Aire/Acetileno:	5.2/2.6 unidades de lectura (escala en el aparato).
Corriente:	3 miliampers (mA).
Longitud de onda:	324.7 nm.
Slit:	0.2 nm.

Se grafican los resultados que se obtienen de absorbancia contra concentración en la figura núm. 1.

c) Determinación de nicotina con cobre.

Se miden alícuotas de la fase orgánica para cada punto de la curva de calibración, se precipitan con una cantidad previamente medida y en exceso de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) de concentración 100 ppm, se mide la absorbancia y se interpola. La cantidad equivalente a 1 mg de  $\text{Cu}^{2+}$  es de 5.11 mg de nicotina.

d) Curva de calibración de zinc.

De la solución de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) de 50 ppm se miden alícuotas de 1 a 8 ml y se aforan a 50 ml con agua destilada, para obtener concentraciones de 1 a 8 ppm de  $\text{Zn}^{2+}$ . Se mide la absorbancia en las siguientes condiciones analíticas.

Aire/Acetileno	5.2/2.6 unidades de lectura (escala en el aparato).
Corriente:	5 miliampers (mA).
Longitud de onda:	213.9 nm
Slit:	0.2 nm

Se grafican los resultados obtenidos de absorbancia contra concentración, ver figura núm. 2.

e) Determinación de nicotina con zinc.

Se miden alícuotas de fase orgánica para cada punto de la curva de calibración y se precipitan con una cantidad previamente medida y en exceso de sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ ) de concentración 100 ppm se miden las absorbancias y se obtiene la concentración de zinc. La cantidad de nicotina equivalente a 1 mg de  $Zn^{2+}$  es de 4.96 mg.

3.3.2. DETERMINACION DE ATROPINA

3.3.2.1. Determinación de atropina por espectrofotometría de absorción atómica.

a) Complejación y extracción de atropina.

1.- Se transfiere una muestra de disolución de atropina de 1 mg/ml al interior de un embudo de separación. Se adiciona solución reactivo de tetratiocianato de cobalto [ $Co(SCN)_4^{2-}$ ], que contiene cobalto en concentración de 0.9360 M.

2.- Se ajusta el pH de la solución por adición de NaOH o HCl 0.1 M. Con agua destilada se lleva hasta un volumen de disolución de 25 ml y se extrae con 10 ml de Cloroformo ( $CHCl_3$ ). Se agita por espacio de 5 minutos y se realizan 3 extracciones sucesivas.

3.- Se separan y reúnen los extractos orgánicos, en un matraz erlenmeyer de 125 ml, se evapora lentamente el disolvente orgánico (Cloroformo), hasta su eliminación total. Se adicionan 10 ml de HCl 0.1 M. y se calienta ligeramente para redissolver el residuo que queda en el matraz.

4.- Se mide la absorbancia de esta solución en las siguientes condiciones analíticas para determinación de cobalto.

Aire/Acetileno: 5.2/2.6 unidades de lectura  
(escala en el aparato).  
Corriente: 5 miliampers (mA).  
Longitud de onda: 240.7 nm  
Slit: 0.1 nm

b) Curva de calibración de cobalto.

De la solución de cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) de 100 ppm, se miden alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 ml, se aforan a 50 ml con agua destilada, para obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 ppm, de cobalto divalente, se miden las absorbancias a las condiciones analíticas establecidas para cobalto y se grafican los resultados, ver figura núm. 3.

3.3.2.2. Estudio de las condiciones óptimas para la extracción de atropina.

a) Influencia del pH.

Se estudia la influencia del pH de 1 a 6 en incrementos unitarios, ajustándolo con HCl o NaOH 0.1 M. Se sigue el procedimiento de extracción y se miden las absorbancias y se grafican en función de pH, para encontrar el pH óptimo de extracción.

b) Influencia de la concentración de  $\text{NH}_4\text{SCN}$ .

Se realiza una variación de la concentración de tiocianato de amonio (1.4, 2.8 y 4.2 M.). y se sigue el mismo procedimiento para la extracción, se miden las absorbancias y se grafican en función del porcentaje de atropina extraída.

c) Influencia de un agente salino, perclorato de potasio ( $\text{KClO}_4$ ).

Se realizó una variación de la concentración de perclorato de potasio, como agente salino, en concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3M siguiéndose el mismo procedimiento para la extracción. Se midieron las absorbancias y sus valores se graficaron en función del porcentaje extraído de atropina.

d) Influencia del tiempo .

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de extracción, anteriores, se realizó esta última con el tiempo de agitación de 10, 20 y 30 minutos. Los resultados se reportan en función del porcentaje de extracción de atropina.

e) Influencia de la Temperatura.

También se estudió la influencia que tiene la temperatura en la extracción de atropina. Este estudio se hizo a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C.) y controlándola primero a 30 °C y después a 40 °C. Con las condiciones óptimas encontradas anteriormente. Los resultados se reportan en función del porcentaje de extracción de atropina.

3.3.2.3. Curva de calibración de atropina con cobalto.

Ya establecidas todas las condiciones óptimas para la extracción de atropina se procede a realizar una curva de calibración, partiendo de una solución estándar de sulfato de atropina de concentración, 1 mg/ml. Se toman alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 ml y se procede de la manera mostrada en la tabla 2.

TABLA 2. SISTEMAS DE EXTRACCION PARA UNA CURVA DE CALIBRACION DE DE ATROPINA CON COBALTO.

Volumen en ml de:	Sistema de extracción					
	1	2	3	4	5	6
Co(SCN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	10	10	10	10	10	10
NH <sub>4</sub> SCN	10	10	10	10	10	10
KClO <sub>4</sub>	3	3	3	3	3	3
Atropina	1	2	3	4	5	6
H <sub>2</sub> O Dest.	6	5	4	3	2	1

El volumen de aforo del sistema de extracción es de 30 ml, el volumen final para determinar la absorbancia es de 10 ml para obtener las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/ml de sulfato de atropina para cada sistema, respectivamente.

Se siguió el mismo procedimiento ya establecido para la extracción del alcaloide, realizándose tres extracciones consecutivas con cloroformo para cada punto de la curva, se reunieron los extractos y se determinó su absorbancia por Absorción atómica.

#### 3.3.2.4. Determinación de sulfato de atropina por espectrofotometría visible ultravioleta.

El sulfato de atropina presenta un espectro de absorción en la región de radiación ultra-violeta, con un máximo de absorción característico a una longitud de onda de 258 nm.

Se realiza una curva de calibración de sulfato de atropina, a partir de una disolución de 2.5 mg/ml. Se toman alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml se aforan a 10 ml y se obtienen las siguientes concentraciones: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25 mg/ml respectivamente, se miden las absorbancias y se grafican los valores correspondientes, los resultados se presentan en la gráfica de la figura núm. 4.

#### 4. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

##### 4.1. DETERMINACION DE NICOTINA.

##### 4.1.1. VALORACION POTENCIOMETRICA.

Después de la obtención del alcaloide nicotina, por medio del proceso de extracción con benceno/clorformo, se llevó a cabo la valoración del alcaloide, los resultados de una curva de valoración representativa se presentan en la Tabla 3 y en la Figura núm. 6. Esta valoración se efectuó con la finalidad de conocer la concentración de nicotina en el extracto orgánico y poderla utilizar como estándar para la realización de las curvas de calibración por E.A.A.

TABLA 3. RESULTADOS DE UNA VALORACION POTENCIOMETRICA DE EXTRACTO ORGANICO DE NICOTINA, CON ACIDO PERCLORICO (0.025053 M.).

ml HClO <sub>4</sub>	E° mv.	ml HClO <sub>4</sub>	E° mv.
0.00	150	9.50	395
1.00	260	10.00	410
2.00	310	10.50	425
3.00	320	11.00	480
4.00	330	11.50	670
5.00	340	12.00	690
6.00	350	12.50	700
7.00	360	13.00	705
8.00	370	14.00	710
9.00	385	15.00	710

Para asegurarse de la ausencia de otras sustancias dentro del extracto orgánico, se realizaron dos pruebas de identificación al mismo:

a) Infrarrojo.

Se obtuvo un espectro de infrarrojo del extracto orgánico en una celda de bromuro de potasio y se comparó con el espectro de nicotina reportado en la bibliografía, comparando unicamente los picos a longitud de onda característicos para nicotina 712, 810, 1022, 1040, 1310, 1575. En la Figura núm. 7 se presenta el espectro de infrarrojo obtenido

b). Espectrofotometría visible-ultravioleta.

Para llevar acabo esta identificación se realizaron dos extracciones en fase acuosa del extracto orgánico, una en medio ácido (con HCl 0.1 M) y otra en medio básico (NaOH 0.1 M) los espectros reportados en la bibliografía presentan máximos de absorbanca característicos, en medio ácido 259 nm y en medio básico 261 nm. Los espectros obtenidos que se presentan en la Figura núm. 8, muestran gran similitud con los reportados en la bibliografía.

Tanto el espectro de infrarrojo como los espectros de ultra-violeta confirman que la nicotina predomina en el extracto y no alguno de los compuestos semejantes extraíbles de las hojas de tabaco.

4.1.1.1. Determinación de la cantidad mínima detectable.

Para determinar la cantidad mínima detectable de nicotina, se fué disminuyendo el volumen de la alícuota valorada, de 5 en 5 ml cada vez, desde un volumen de 25 ml hasta 5 ml. Para llevar a cabo este estudio se trabajaron dos diferentes extractos orgánicos de diferente tipo de tabaco comercial, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

En esta tabla se presentan las concentraciones promedio de tres valoraciones realizadas por alícuota y éstas corresponden a la concetración del extracto original.

TABLA 4. VALORACION DE DIFERENTES ALICUOTAS DE EXTRACTO ORGANICO DE NICOTINA.

Alicuotas. (ml)	Concentraciones (mg/ml).	
	Tabaco (faros).	Tabaco (alas).
50	0.755	0.605
25	0.756	0.610
20	0.766	0.602
15	0.754	0.603
10	0.767	0.612
05	0.751	0.607

De los datos de esta tabla, se puede observar que es posible valorar nicotina hasta una concentración mínima de 0.602 mg/ml, obteniéndose una curva en la que se observa el cambio de potencial y puede determinar confiablemente el punto de equivalencia.

Para el caso del tipo de tabaco Faros, el promedio de todas las valoraciones ( $\bar{x}$ ) y su desviación estándar relativa (DSR) son:

$$\bar{x} = 0.758 \text{ mg/ml} \qquad \text{DSR} = 0.0066\%$$

Para el caso del tipo de tabaco Alas, el promedio de todas las valoraciones ( $\bar{x}$ ) y su desviación estándar relativa (DSR) son:

$$\bar{x} = 0.606 \text{ mg /ml} \qquad \text{DSR} = 0.0042\%$$

Los resultados de DSR, nos indican que hay una buena repetibilidad de la técnica entre cada uno de los ensayos para diferente volumen de alicuota valorada.

#### 4.1.1.2. Determinación del por ciento en peso para diferentes tipos de tabaco

Como un estudio adicional, se determinó la cantidad de nicotina presente en cinco diferentes tipos de tabaco de cigarrillos elegidos al azar: Faros, Alas, Marlboro lights, Marlboro y Raleigh.

Para cada tipo de tabaco se obtuvo su extracto orgánico y se valoró potenciométricamente como se indica en la sección 3.3.1.2. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

TABLA 5. VALORES OBTENIDOS DE NICOTINA POR CADA MARCA DE CIGARROS.

Tabaco	Peso mta. gramos	Conc. mg/ml	Por ciento en peso (%)
Faros	3.0747	0.758	2.4652
Alas	3.0606	0.606	1.9800
M. ligths	3.0650	0.531	1.7324
M. rojos	3.1397	0.575	1.8916
Raleigh	3.0964	0.599	1.9345

#### 4.1.2. DETERMINACION POR ABSORCION ATOMICA.

##### 4.1.2.1. Determinación con cobre.

Con propósitos de referencia, se obtiene la curva de calibración para el ion  $\text{Cu}^{2+}$  por absorción atómica partiendo de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , los resultados se presentan en la Figura núm. 1.

Para llevar a cabo el estudio de determinación del alcaloide nicotina con cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ), se realizaron diversos ensayos para llegar a la estandarización de la técnica, que es la presentada en la sección 3.3.1.3.

TABLA 6. CURVA DE CALIBRACION DE NICOTINA CON COBRE POR EAA.  
(Ver Figura núm. 9)

Concentración $10^{-2}$ mg/ml	Absorbancia a 324.7 nm
1.0297	0.222
2.0593	0.320
3.0890	0.405
4.1187	0.506
5.1483	0.616
6.1780	0.718
7.2077	0.834
8.2374	0.941

De esta curva de calibración de nicotina con cobre, podemos observar que tiene el mismo comportamiento que la curva de calibración para cobre estándar. Presenta los siguientes datos, producto de la regresión lineal:

$$y = A + Bx.$$

Intercepto	Pendiente	Correlación
A = 0.1067	B = 0.1000	r = 0.9992

Estos datos nos indican que, al obtenerse una buena linealidad, esta técnica puede ser utilizada para fines cuantitativos. El resto de las curvas de calibración para nicotina con que se obtuvieron durante este estudio, se presentan en la siguiente tabla.

TABLA 7. DATOS DE CORRELACION DE CADA UNA DE LAS CURVAS DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA CON COBRE.

Curva	n	A	B	r	$\Delta x$
1	4	0.0475	0.1142	0.9991	1.5 - 6.2
2	4	0.1055	0.0998	0.9996	1.2 - 4.8
3	4	0.1420	0.0991	0.9993	1.1 - 4.5
4	5	0.1170	0.2188	0.9991	0.5 - 2.6
5	5	0.1439	0.0902	0.9988	1.2 - 6.4
6	5	0.1425	0.0912	0.9985	1.2 - 6.4
7	5	0.1469	0.0906	0.9992	1.1 - 5.7
8	6	0.1033	0.0995	0.9993	1.0 - 6.2
9	8	0.0954	0.1513	0.9991	0.6 - 4.5
10	8	0.1067	0.1000	0.9992	1.0 - 8.2

Donde:

n = número de puntos en la curva.

A = intercepto u ordenada al origen.

B = pendiente.

r = correlación.

$\Delta x$  = Intervalo de determinación ( $\times 10^{-2}$  mg/ml).

Como se puede observar de la tabla 7, para todas las curvas su pendiente se encuentra alrededor de  $B = 0.1$  y su correspondiente correlación no es menor de  $r = 0.99$ , lo cual nos indica que la técnica analítica presenta una buena repetibilidad.

El intervalo de determinación lineal, en promedio, es de:

1.15 a  $5.60 \times 10^{-2}$  mg/ml de nicotina.

o bien, en  $\mu\text{g/ml}$ :

11.5 a 56  $\mu\text{g/ml}$  de nicotina.

Es de mencionarse que, a mayor número de puntos en la curva (mayor cantidad de estándares), es posible tener un intervalo lineal mas grande y mejor correlación de los puntos. Pero también es de mencionarse que la variabilidad observada se debe a los diversos pasos seguidos en la técnica. Para tener datos menos dispersos, es necesario tener experiencia en la realización de esta técnica y brindarle el mayor de los cuidados.

Por otro lado, para conocer el grado de precisión que puede tenerse al realizar una determinación con estas curvas, se calculó la precisión para un estándar como si fuese una concentración determinada en una muestra, los resultados se presentan en la Tabla 8.

TABLA 8. DATOS DE PRECISION PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA CON COBRE.

Curva núm.	mún. de puntos	Concentración determinada	Precisión (%)
8	6	0.06018 mg/ml	9.09
9	8	0.04007 mg/ml	7.98
10	8	0.05980 mg/ml	8.16

#### 4.1.2.2. Determinación con zinc.

Siguiendo el mismo procedimiento que en la determinación con cobre, se llevó a cabo el estudio de la determinación de nicotina con zinc.

La curva de calibración de zinc fué preparada a partir de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , se presenta en la figura núm. 2. En la Figura núm. 10 se presenta una curva de calibración para la determinación de nicotina con zinc y en la Tabla 9 se presentan los valores de absorbancia de la misma, obtenidos como se indica en la sección 3.3.1.3.

**TABLA 9. CURVA DE CALIBRACION DE NICOTINA CON ZINC POR EAA.**  
(Ver Figura núm. 10)

Concentración $10^{-2}$ mg/ml	Absorbancia 213.9 nm
0.8335	0.215
1.6670	0.361
2.5005	0.485
3.3340	0.610
4.1675	0.759
5.0010	0.879
5.8345	0.930

Los datos de correlación para esta curva son:

A = 0.0876

B = 0.1590

r = 0.9996

En lo que se refiere a la repetibilidad, en la tabla 10 se muestran los resultados para cinco curvas de calibración

**TABLA 10. CURVAS DE CALIBRACION DE NICOTINA CON ZINC.**

Curva	n	A	B	r	$\Delta x$
1	6	0.1016	0.1488	0.9993	0.8 - 4.8
2	6	0.0876	0.1590	0.9996	0.8 - 5.0
3	6	0.0695	0.1656	0.9996	0.7 - 4.5
4	7	0.0941	0.1532	0.9997	0.7 - 5.5
5	7	0.0846	0.1589	0.9997	0.7 - 5.2

Donde:

n = número de puntos en la curva.

A = intercepto u ordenada al origen.

B = pendiente.

r = correlación.

Ax = Intervalo de determinación ( $\times 10^{-2}$  mg/ml).

De esta tabla, se observa que la pendiente de las curvas experimentales se encuentra alrededor de  $B = 0.15$  y su correspondiente correlación no es menor de  $r = 0.999$ , lo cual nos indica que la técnica analítica presenta una buena linealidad y repetibilidad.

El intervalo de determinación lineal, en promedio, es de:

0.75 a  $5.00 \times 10^{-2}$  mg/ml de nicotina

o bien, en  $\mu\text{g/ml}$ :

7.5 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de nicotina.

Como es el caso para la determinación con cobre, se observa que, a mayor número de puntos en la curva (mayor cantidad de estándares) es posible tener un intervalo lineal más grande. También es de recomendarse el tener precaución al ejecutar esta técnica. En general se tienen mejores resultados que con cobre, se observa que el intervalo de determinación lineal con zinc presenta valores algo menores que los obtenidos para cobre, aunque el intervalo total de zinc es menor.

Por otro lado, para conocer el grado de precisión que puede tenerse al realizar una determinación con estas curvas, se calculó la precisión para un estándar como si se tratase de una muestra, los resultados se presentan en la Tabla 11.

TABLA 11. DATOS DE PRECISION PARA LA DETERMINACION DE NICOTINA CON ZINC.

Curva núm.	núm. de puntos	Concentración determinada	Precisión (%)
1	6	0.0439 mg/ml	9.56
2	6	0.0328 mg/ml	8.35
3	6	0.0384 mg/ml	7.42
4	7	0.0335 mg/ml	6.42
5	7	0.0330 mg/ml	5.92

#### 4.2. DETERMINACION DE ATROPINA.

##### 4.2.1. DETERMINACION POR ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE-ULTRAVIOLETA.

Se realizó la determinación de Sulfato de atropina por espectrofotometría de visible-ultravioleta, como se indica en la sección 3.3.2.4. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12 y en la Figura núm. 4.

Los datos de correlación de esta curva son:

$$A = -0.0126$$

$$B = 0.7488$$

$$r = 0.9995$$

La curva presenta buena linealidad, con una correlación mayor de  $r = 0.999$  en un intervalo de concentraciones o de linealidad de 0.25 a 1.25 mg/ml.

A manera de identificación del estándar de sulfato de atropina, se realizó el barrido de una disolución de 1 mg/ml de 360 a 200 nm. Siendo similar al reportado en la bibliografía (Clarke's, 1986) [21].

El espectro de absorción del compuesto se presenta en la Figura núm. 5.

TABLA 12. CURVA DE CALIBRACION DE SULFATO DE ATROPINA POR V-UV.  
(Ver Figura núm. 4)

Concentración mg/ml	Absorbancia 258 nm.
0.25	0.185
0.50	0.354
0.75	0.538
1.00	0.740
1.25	0.928

#### 4.2.2. DETERMINACION POR ABSORCION ATOMICA.

Como en casos anteriores, se obtuvo la curva de calibración de Cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) acuoso como referencia para el estudio. Esta curva se presenta en la Figura núm. 3.

##### 4.2.2.1. Influencia de los factores que afectan la extracción.

Con el propósito de establecer las condiciones óptimas de trabajo para la extracción del alcaloide, se estudiaron varios factores que influyen en el rendimiento de extracción del par iónico  $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$  - atropina, cuyos resultados se exponen a continuación.

##### a) Influencia del pH en la extracción.

Se prepararon varios sistemas de extracción conteniendo el alcaloide, se ajustó el pH de cada uno de los sistema de extracción (con NaOH o HCl 0.1 N), utilizando un potenciómetro y electrodos de pH y calomel. Los resultados de las extracciones a diferentes valores de pH, se presentan en la Tabla 13 y en la Figura núm. 11, en la que se observa que el pH óptimo de extracción es de 4.

TABLA 13. INFLUENCIA DEL PH.

Unidades de pH	Absorbancia 240.7 nm
1	0.122
2	0.154
3	0.171
4	0.176
5	0.175
6	0.143

b) Influencia de la concentración de tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ).

Con la finalidad de ver la influencia que tiene el tiocianato de amonio sobre la estabilidad del complejo de  $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$ . Se probaron tres diferentes concentraciones, calculándose el rendimiento de extracción de atropina. Los resultados se presentan en la Tabla 15 y en la Figura núm. 12.

TABLA 14. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE  
TIOCIANATO DE AMONIO.

Concentración $\text{NH}_4\text{SCN}$ M.	Extracción (%).
1.4	22.00
2.8	32.00
4.2	39.00

De los resultados se observa que la concentración de tiocianato de amonio influye de manera muy significativa sobre la extracción del alcaloide atropina. La especie  $\text{SCN}^-$  en exceso, proveniente de  $\text{NH}_4\text{SCN}$

está desplazando el equilibrio químico hacia la formación del complejo de cobalto, lo cuál asegura que la extracción del alcaloide va a ser más importante, por lo que se tendrá mayor rendimiento. La concentración de tiocianato de amonio que se utilizará en los ensayos siguientes es de 4.2 M.

c) Influencia de un agente salino ( $KClO_4$ ).

Se estudió la influencia de un agente salino para favorecer la extracción del par iónico. Para el estudio se escogió perclorato de potasio.

Los resultados se muestran en la Tabla 15 y en la Figura núm. 13, de donde se observa que el rendimiento en la extracción se ve afectado considerablemente con el uso del perclorato de potasio, sin que para ello se requieran grandes concentraciones de agente salino, encontrándose que con una concentración de 0.1 M de perclorato de potasio, se se mejora sustancialmente el rendimiento de la extracción.

TABLA 15. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE PERCLORATO DE POTASIO.

Concentración $KClO_4$ M.	Extracción (%).
0.00	32.06
0.10	62.40
0.20	55.88
0.30	36.90

d) Influencia en el tiempo de agitación.

Para determinar el tiempo necesario de agitación que se requiere para lograr un mayor rendimiento en la extracción, se probaron 3 diferentes intervalos de tiempo: 5, 10 y 15 minutos, para cada uno de

ellos se llevaron a cabo 3 extracciones consecutivas de 10 ml de cloroformo. Al final se mezclaron los 3 extractos de cada intervalo y se determinó el rendimiento total. Los resultados se presentan en la Tabla 16 y en la Figura núm. 14.

TABLA 16 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION.

Tiempo minutos	Extracción (%)
05	63.06
10	62.61
15	62.88

De acuerdo con los resultados obtenidos se tiene que el tiempo de agitación no es un factor que determine el rendimiento de extracción, ya que para los tres diferentes tiempos la variación en el rendimiento es poco significativo. Encontrándose que es suficiente un tiempo de agitación de 5 minutos.

e) Influencia de la temperatura.

El último de los factores fué el de temperatura en el rendimiento de la extracción. Se escogieron 3 diferentes temperaturas; 25, 30 y 40 °C. No se estudió ninguna otra temperatura debido a la dificultad en la agitación y estabilidad del sistema, puesto que la fase orgánica utilizada para la extracción es muy volátil. Los resultados se presentan en la Tabla 17 y en la Figura núm. 15.

Es interesante observar que el rendimiento de la extracción se ve muy deteriorado al aumentar la temperatura, por lo que es importante realizar esta extracción a temperatura ambiente y enfriar la(s) solución(es) que por alguna razón estén a temperaturas más altas

TABLA 13. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Temperatura °C	Extracción (%).
25	63.50
30	44.56
40	37.16

4.2.2.2. Condiciones experimentales óptimas.

Después de los estudios realizados, se llegó al establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción del alcaloide atropina:

- a) Tres extracciones sucesivas.
- b) pH de 4.0.
- c) Concentración 4.2 M. de  $\text{NH}_4\text{SCN}$ .
- d) Concentración 0.1 M. de  $(\text{KClO}_4)$ .
- e) Tiempo de agitación de 5 minutos.
- f) Temperatura ambiente (25 °C.).

4.2.2.3. Curva de calibración de atropina con cobalto.

Considerando las condiciones experimentales ya establecidas para la extracción de atropina se construyó una curva de calibración de atropina con cobalto, cuyos resultados se presentan en la tabla 18 y en la Figura núm. 16.

Los datos de regresión de esta curva, considerando hasta el sexto estándar (0.6 mg/ml) son:

$$A = 0.0712$$

$$B = 0.2126$$

$$r = 0.9994$$

TABLA 18. CURVA DE CALIBRACION DE ATROPINA CON COBALTO.

Concentración mg/ml	Absorbancia 240.7 nm
0.1	0.092
0.2	0.115
0.3	0.133
0.4	0.158
0.5	0.178
0.6	0.198

Estos datos nos indican que este método puede utilizarse para fines cuantitativos en un intervalo de determinación de

0.1 a 0.6 mg/ml de atropina,

o bien, de

100 a 600  $\mu$ g/ml de atropina

En cuanto a la repetitibilidad de esta curva de calibración, se presenta en la Tabla 19, Los resultados de tres curvas de calibración.

TABLA 19. CURVAS DE CALIBRACION DE ATROPINA CON COBALTO.

Curva	n	A	B	r	$\Delta x$
1	5	0.0675	0.2430	0.9990	0.1 - 0.5
2	6	0.0712	0.2126	0.9994	0.1 - 0.6
3	6	0.0688	0.2148	0.9995	0.1 - 0.6

Donde:

n = Número de puntos en la curva.

A = Intercepto u ordenada al origen.

B = Pendiente.

r = Correlación.

Ax = Intervalo de determinación ( $\times 10^{-2}$  mg/ml).

No obstante, cabe mencionar que, a pesar de que se consideraron todas las condiciones óptimas y de que esta técnica puede tener aplicaciones cuantitativas, no se obtuvo un rendimiento de extracción cercano al 100%. En caso de tenerlo, se podría disminuir el límite inferior a la mitad, aproximadamente.

Puesto que se estudiaron todas las condiciones óptimas, lo que resta suponer es que el disolvente utilizado (cloroformo), es el causante de tan bajos rendimientos. Consecuentemente, en un estudio posterior, objeto de otra tesis, se ensayará la extracción de alcaloides con otro disolvente.

#### 4.3. RESUMEN DE RESULTADOS.

Se presenta un resumen de los resultados obtenidos para la determinación de los alcaloides en estudio, comparando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con otra técnica analítica.

##### 4.3.1. DETERMINACION DE NICOTINA.

###### I. Potenciometría

Cantidad mínima detectable de 0.532 mg/ml, determinada en la sección 4.1.1.1.

###### II. Absorción Atómica

###### a) Determinación con cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

Intervalo de determinación: 0.0115 - 0.0560 mg/ml

Cantidad mínima detectable: 0.0115 mg/ml

Ecuación de la recta:  $A = (0.107 \pm 0.016) + (0.10 \pm 0.0031)C$

b) Determinación con zinc ( $Zn^{2+}$ ).

Intervalo de determinación: 0.0075 - 0.0500 mg/ml

Cantidad mínima detectable: 0.0075 mg/ml

Ecuación de la recta:  $A = (0.087 \pm 0.015) + (0.16 \pm 0.0047)C$

4.3.2. DETERMINACION DE ATROPINA.

I. Visible-ultra violeta.

Intervalo de determinación: 0.25 - 1.25 mg/ml

Cantidad mínima detectable: 0.25 mg/ml

Ecuación de la recta:  $A = (-0.013 \pm 0.032) + (0.75 \pm 0.026)C$

II. Absorción atómica.

Intervalo de determinación: 0.10 - 0.60 mg/ml

Cantidad mínima detectable: 0.10 mg/ml

Ecuación de la recta:  $A = (0.071 \pm 0.0078) + (0.212 \pm 0.003)C$

De acuerdo con los resultados obtenidos para la determinación del alcaloide nicotina, la técnica por valoración potenciométrica, es un método seguro que nos permite la determinación del alcaloide hasta una concentración mínima de 0.532 mg/ml.

Comparada con la técnica por absorción atómica, se puede observar una diferencia significativa en la cantidad mínima detectable, siendo de 0.0115 mg/ml para cobre y 0.0075 mg/ml para zinc.

Si se lleva a cabo la determinación con zinc, se obtienen mejores resultados que cuando se realiza con cobre. Ambos metales presentan buena linealidad con una correlación muy buena, en las diferentes curvas obtenidas, lo cual nos muestra la repetibilidad de la técnica.

En cuanto a los resultados para la determinación cuantitativa de atropina por espectrofotometría visible-ultravioleta, se encontró una cantidad mínima detectable de 0.25 mg/ml, teniéndose correlaciones no menores de  $r = 0.999$ .

Por otro lado para la determinación de atropina por absorción atómica, se tiene una cantidad mínima detectable de 0.10 mg/ml (mejor a la encontrada por visible-ultravioleta) y una correlación no menor de  $r = 0.999$ .

## 5. CONCLUSIONES.

### 5.1. NICOTINA.

El estudio de los parámetros que pueden intervenir en la cuantificación de nicotina por Espectrofotometría de absorción atómica, permitió que se establecieran las condiciones óptimas, llegándose al establecimiento de la técnica mediante el uso de los iones metálicos cobre y zinc.

En el caso de la determinación con cobre, se encontró que las curvas de calibración presentan una buena linealidad, con una correlación no menor de  $r = 0.99$ , indicando que la técnica tiene buena repetibilidad y que pueden ser utilizadas con fines cuantitativos. La cantidad mínima detectable con esta determinación, es de 0.0115 mg/ml de nicotina.

La aplicabilidad, con fines cuantitativos, de las curvas de calibración, se ve reforzada al calcular la precisión de una determinación. Si ésta se realiza en el centro de los puntos de la curva, se encuentra que  $5\% < \text{precisión} < 10\%$ , lo que la hace una técnica analítica bastante aceptable. Cabe mencionar que, para tener buenos o mejores resultados en la precisión, es necesario incrementar la cantidad de puntos en la curva y adquirir cierta experiencia en su desarrollo experimental.

Como un estudio paralelo, se determinaron las condiciones óptimas para la determinación con zinc. Las curvas de calibración con éste metal, presentan una correlación no menor de  $r = 0.999$ , indicando que se tiene una linealidad y repetibilidad mejor que la de los resultados obtenidos con el cobre. La cantidad mínima detectable 0.0075 mg/ml, es menor que la obtenida con cobre. La precisión obtenida también se encuentra entre:  $5\% < \text{precisión} < 10\%$ . Concluyéndose que la determinación con zinc es analíticamente buena y también puede utilizarse con fines cuantitativos.

Como referencia, se determinó la cantidad mínima de nicotina

cuantificable por el ya conocido método potenciométrico, encontrándose que se pueden valorar concentraciones de alrededor de 0.5 mg/ml, cantidad que es muy superior a la que se puede determinar con las dos técnicas anteriores.

## 5.2. ATROPINA.

Para la determinación de atropina por espectrofotometría de absorción atómica, basada en la extracción del alcaloide con el tetratiocianato de cobalto, se estudiaron y establecieron los factores que influyen sobre el sistema de extracción del alcaloide, a saber: pH óptimo de 4.0, concentración de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  de 4.2 M (con lo que se asegura la formación del complejo extractante de tetratiocianato de cobalto  $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$  que a su vez forma con el alcaloide el par iónico extraíble) y 0.1 M de perclorato de potasio como agente salino. La extracción se realiza con tres volúmenes sucesivos de 10 ml de cloroformo, agitando durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La curva de calibración obtenida con la técnica anterior tiene una correlación no menor de  $r = 0.999$ , lo que indica una buena linealidad y obteniéndose un intervalo de determinación de 0.1 - 0.6 mg/ml de nicotina. Cabe mencionar que, aún considerando las condiciones óptimas para la extracción del alcaloide, no se obtuvo un rendimiento de extracción cercano al 100%.

En comparación con la determinación de atropina por espectrofotometría de visible-ultravioleta, con ésta última se obtienen curvas de calibración con correlación no menor de  $r = 0.999$  y un intervalo de determinación de 0.25 - 1.25 mg/ml.

Ambas técnicas son aplicables, con la salvedad de que sus intervalos de determinación son diferentes y de que la posibilidad de interferencias en la determinación por v-ultravioleta es mucho mayor.

Con base en el estudio realizado de las condiciones óptimas para la determinación de atropina con tetratiocianato de cobalto, es de suponerse que el disolvente cloroformo empleado para la extracción, sea el causante de los bajos rendimientos, que no permitieron el cálculo de precisión para esta técnica. Por lo que, se inició el estudio con otro disolvente y que es motivo de los trabajos de otra tesis.

6. FIGURAS.

## Curva de Calibración de cobre estándar

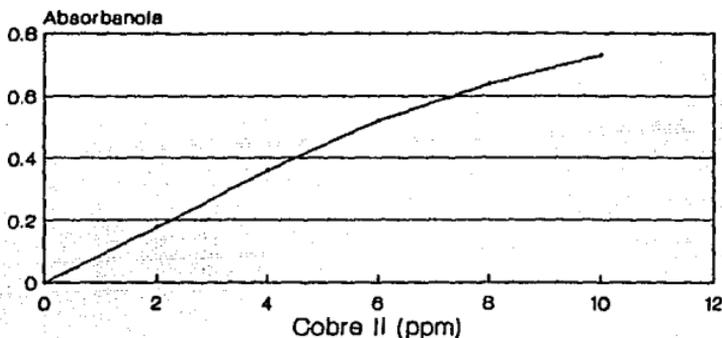


Figura num. 1. Curva de calibración de cobre estándar en solución acuosa.

## Curva de Calibración de zinc estándar

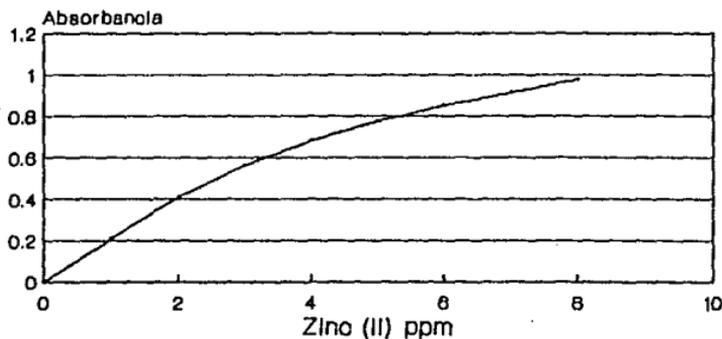


Figura num. 2. Curva de calibración de zinc estándar en solución acuosa.

## Curva de Calibración de cobalto estándar

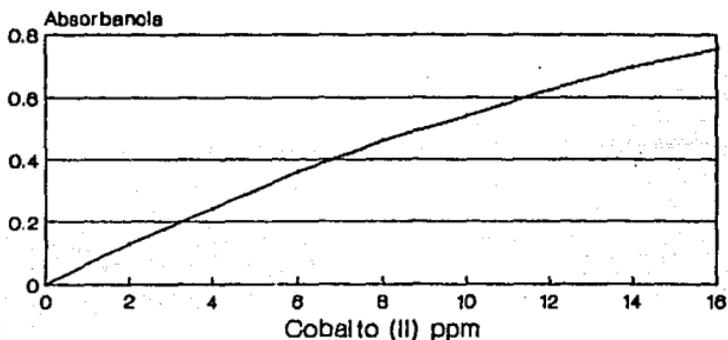


Figura num. 3. Curva de calibración de cobalto estándar en solución acuosa.

## Curva de Calibración sulfato de atropina estándar

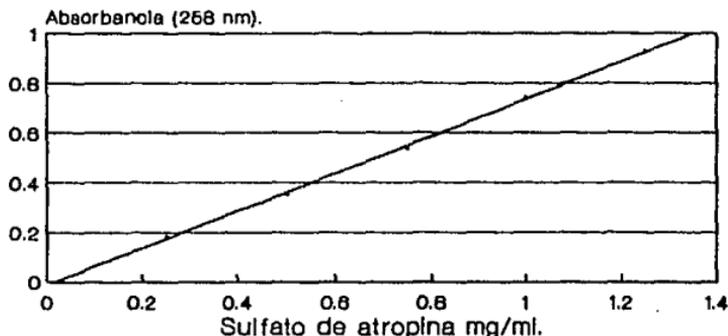


Figura num. 4. Curva de calibración de sulfato de atropina en solución acuosa.

## Curva de valoración potenciométrica de nicotina

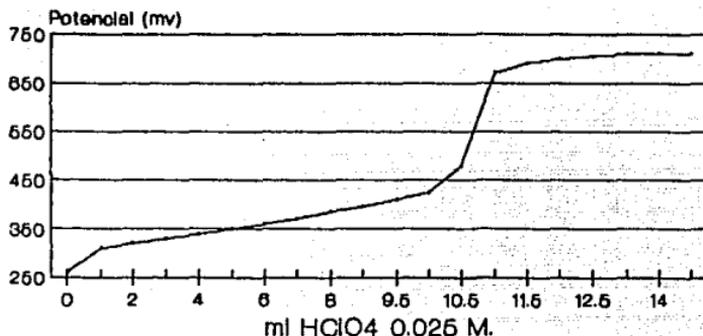


Figura num. 6. Valoración potenciométrica de extracto orgánico de nicotina.

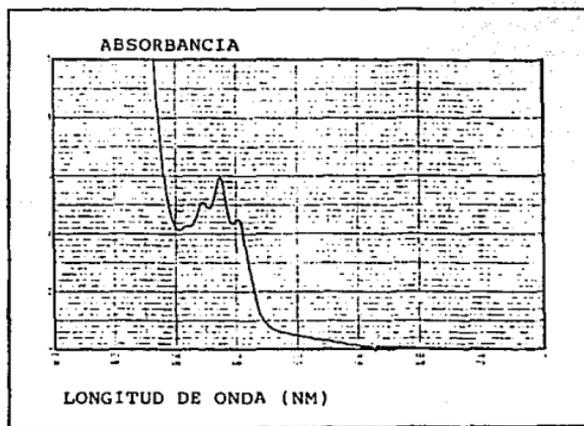


Figura núm. 5. Espectro visible ultravioleta. Barrido de una disolución de sulfato de atropina (1 mg/ml), de 200 a 360 nm.

# Curva de Calibración de nicotina con cobre

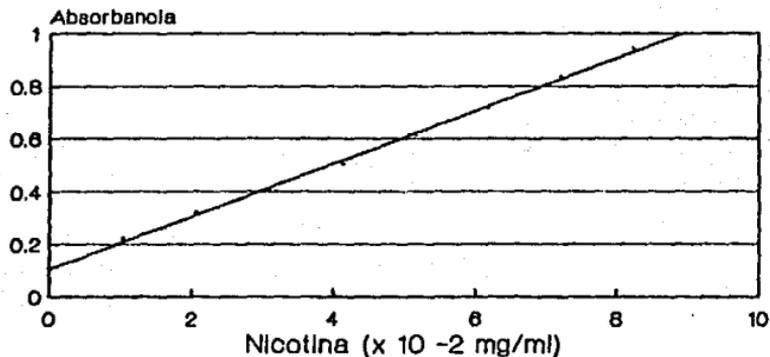


Figura num. 9. Curva de calibración  
de nicotina con cobre

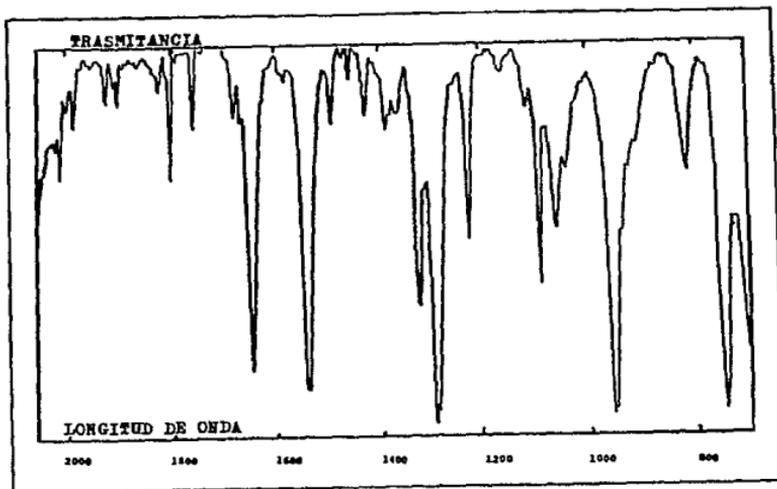


Figura núm. 7. Espectro de infrarrojo del extracto orgánico de  
nicotina.

## Curva de Calibración de nicotina con zinc

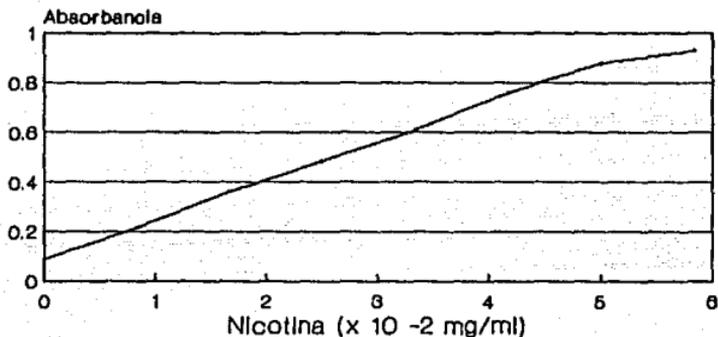


Figura num. 10. Curva de Calibración de nicotina con zinc.

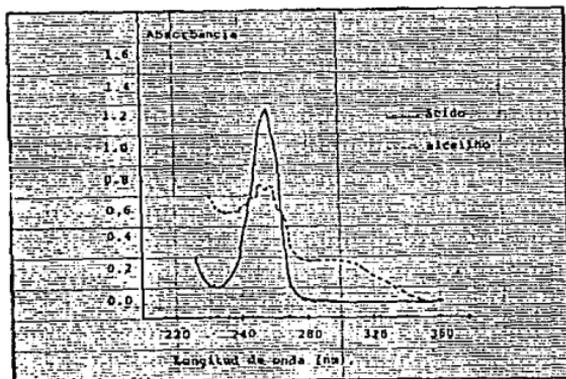


Figura núm. 8. Espectros visible ultravioleta de extracto orgánico de nicotina en medio ácido y básico.

## Influencia de pH sulfato de atropina

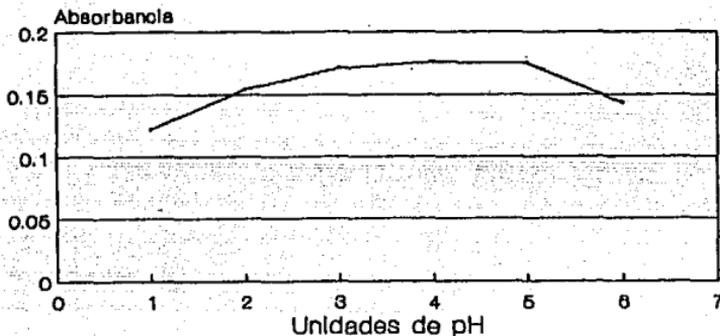


Figura num. 11. Influencia del pH en la extracción de sulfato de atropina.

## Influencia de Concentración de tiocianato de amonio

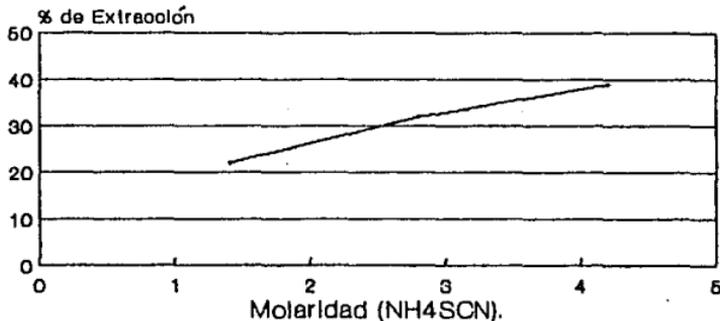


Figura num. 12. Influencia de la concentración de tiocianato de amonio en la extracción de sulfato de atropina.

## Influencia de Concentración de perclorato de potasio

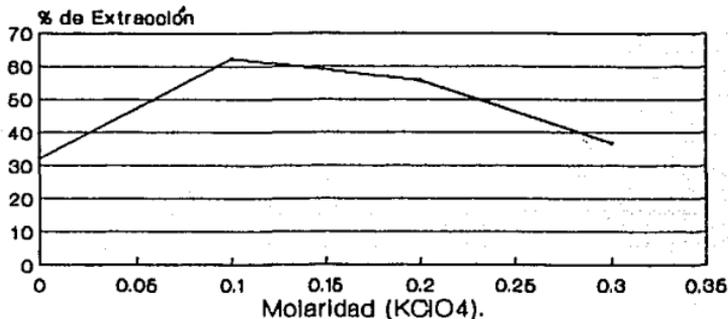


Figura num. 13. Influencia de la concentración de perclorato de potasio, en la extracción de sulfato de atropina.

## Curva de Influencia del tiempo de agitación

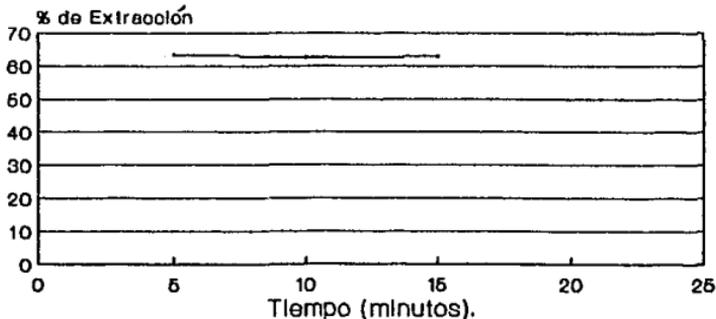


Figura num. 14. Influencia del tiempo de agitación, en la extracción de sulfato de atropina.

## Curva de Influencia de la temperatura

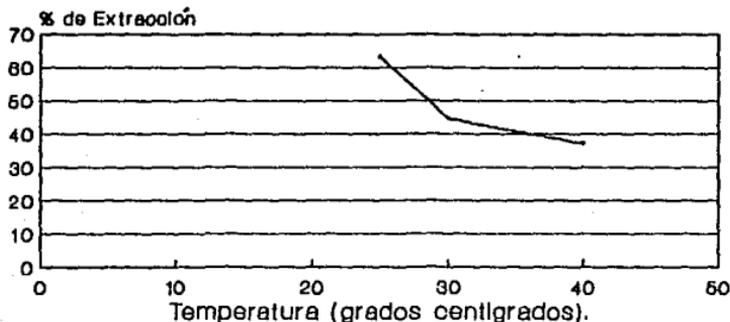


Figura num. 16. Influencia de la temperatura, en la extracción de sulfato de atropina.

## Curva de Calibración atropina con cobalto

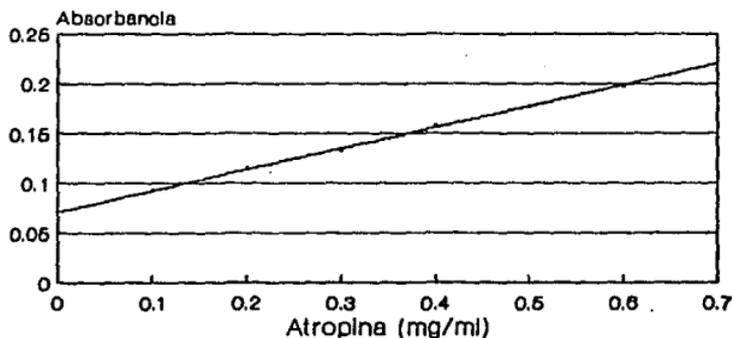


Figura num. 16. Curva de calibración, de sulfato de atropina con cobalto.

6. BIBLIOGRAFIA.

- 01). Al-zamil, I. Z., Aziz-Alrahman, A.M., "Indirect atomic absorption spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid in tablets", [Coll. Sci. King Saudi Univ. Rigadh, Saudi Arabia (*J. Chem. Soc. Pak.* 4 (4), 1982 p. 249-250)], *Chem. Abs.*, 98, 98: 149649z, (1983).
- 02). Ayad, M.M., Khayyal, S.E., "Atomic absorption determination of nicotine in tobacco", *Spectrochim. acta*, 40B, No. 8, 1127-1131, (1985).
- 03). Ayad, M. M., Khayyal, S. E., "Indirect determination of pilocarpine by atomic absorption espectrumetry", *Microchem. J.*, 33, 371-375, (1986).
- 04). Efstathiou, C. E., Diamandis, E. P., "Potentiometric determination of nicotine in tobacco products with a nicotine sensitive, liquid membrane electrode", *Anal. Chim. Acta*, 127, 173-180, (1981).
- 05). Gallegos, M., "Indirect atomic absorption determination of anionic surfactants in waste-waters by flow injection, continuous liquid-liquid extraction", *Anal. Chem.*, 58, No. 11, 2265-2269, (1986).
- 06). Grasso, G., "Determination of nonionic surfactans in water and waste-water by atomic absorption spectrometry", *Atomic spectros.*, 7, No. 4, 93-95, (1986).

- 07). Grubner, O., First, W. M., "Gas chromatographic determination of nicotine in gases and liquids with suppression of adsorption effects", *Anal. Chem.*, 52, 1755-1758, (1980).
  
- 08). Hassan, S. M., Metwally, M. S., "Determination of certain aminoquinoline, antimalarials through ternary complex formation", *Analyst*, 107, 1235-1240, (1982).
  
- 09). Holcombe, J. A., "Atomic absorption, absorption fluorescence and flame emission spectrometry", *Fundamental reviews, Anal. Chem.*, 60, No. 12, 226R-252R, (1988).
  
- 10). Horlick, G., "Atomic absorption, absorption fluorescence and flame emission spectrometry", *Fundamental reviews, Anal. Chem.*, 56, No. 5, 278R-292R, (1984).
  
- 11). Jackson, K. E., "Alkaloids of tobacco", *Review and bibliography; Chemical Rev.*, 29, 123-197, (1941).
  
- 12). Kalvoda, R., "Adsorptive accumulation in stripping voltametry", *Anal. Chim. Acta*, 138, 11-18, (1982).
  
- 13). Minami, Y., Mitsui, T., "Indirect determination of  $\alpha$ -amino acids by atomic absorption spectrophotometry", [*Sci. Invest. Res. Lab. Osaka Japan (Bunseki Kagaku*, 32 (3), 1983, p. 206-209)]. *Organic Anal. Chem.*, 99, 99:15852x, (1983).

- 14). Minami, Y., Mitsui, T., "Indirect determination of barbituric acid derivatives by atomic absorption spectrophotometric", [Sci. Invest. Res. Lab. Osaka Japan (Bunseki Kagaku, 31 (10), 1982, p. 604-607)] Chem. Abs., 98, No. 6, 98:40656, (1983).
  
- 15). Montero, R., Gallego, M., "Indirect atomic absorption spectrometric determination of local anaesthetics in pharmaceutical preparations with a flow-injection precipitation technique", *Anal. Chim. Acta*, 215, 241-248, (1988).
  
- 16). Nerin, C., Garnica, A., "Indirect determination of alkaloids and drugs by atomic absorption spectrometry", *Anal. Chem.*, 57, 34-38, (1985).
  
- 17). Nerin, C., Garnica, A., "Indirect determination of nitrogenated drugs by atomic absorption spectrometry", *Anal. Chem.* 58, 2617-2621, (1985).
  
- 18). Sakai, T., Ohno, N., Wakisaka, T., "Selective determination of histamine by solvent extraction and atomic absorption spectrophotometry", [Dep. Chem., Gifu. Coll. Dent., Japan (Bunseki Kagaku, 1982, 31(7), 356-361)]., *Chem. abs.*, 97, No. 18, 97:1555628n, (1982).
  
- 19). Saunders, J. A., Blume D. E., "Quantitation of major tobacco alkaloids by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatog.*, 205, 147-155, (1981).

- 20). Association of official analytical chemists.  
OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (AOAC).  
Fourteen edition,  
Edited by Sidney Williams  
Arlington, Virginia, (1984)  
p. 62-64 y 742-743.
- 21). Clarke's.  
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS.  
Second edition,  
The Pharmaceutical Press.  
London, (1986).  
p. 363-364 y 807-808.
- 22). Dick J. G.  
QUIMICA ANALITICA.  
Primera reimpression,  
El manual moderno.  
México, D. F., (1981).  
p. 677-680.
- 23) Ramette R. W.  
EQUILIBRIO Y ANALISIS QUIMICO  
Primera edición  
Fondo educativo interamericano  
U. S. A. (1983).  
p. 49-81.
- 24). Rahway, N. J.  
THE INDEX MERCK  
(ENCICLOPEDIA OF CHEMICALS AND DRUGS).  
Ninth edition  
Merck and Co. Inc.  
U. S. A., (1976).  
p. 117-935.

- 25). Skoog D. A., West, D. M.  
QUIMICA ANALITICA.  
Cuarta edición,  
Mc. Graw-Hill.  
Madrid, (1988).  
p. 494 - 504.
- 26). Valcárcel, M., Silva, M.  
TEORIA Y PRACTICA DE LA EXTRACCION  
LIQUIDO-LIQUIDO.  
Primera edición,  
Editorial Alhambra.  
Madrid, (1984).  
p. 3-6, 86-92, 121-123, y 136-137.
- 27). Walton, F., Harold., Reyes, J.  
MODERN CHEMICAL ANALYSIS.  
Marcel Dekker Inc.  
New York, (1973).  
p. 218-228.
- 28). Watty, B., M.  
QUIMICA ANALITICA.  
Primera edición,  
Editorial Alhambra Mexicana.  
México, D. F., (1982).  
p. 461-475.
- 29). Willard, M., Dean.  
METODOS INSTRUMENTALES.  
Sexta impresión,  
C. E. C. S. A.  
México, D. F., (1984).  
p. 383-392.