

13  
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DEL METODO DEL ACIDO  
TIOBARBITURICO EN SISTEMAS  
SUPRAMOLECULARES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :**

**SOFIA VANIA ERAZO CASTREJON**



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*A mi abuelita Amalia por ser ejemplo de lucha,  
fuerza, valentía y coraje, por estar siempre conmigo,  
ser mi cómplice y todo lo que en mi dejaste.*

*A mis padres por la entrega absoluta, por ser pilares  
de ese maravilloso hogar donde siempre he encontrado  
todo el amor, fuerza y apoyo para crecer y realizarme.  
Por ser ante todo amigos y porque sin ellos, sería nada.*

*A Iván porque a pesar de todo y en silencio has estado  
conmigo.....*

*A las "cuatitas" Tania y Karla por las porras y la  
responsabilidad de ser mejor.....*

*a los tres por aquellas tardes, pero sobre todo por ser parte  
de mi vida.*

*A mi Tío Caco y mi Tía Grande, por los "consejos", quererme tanto y hacerme la niña más consentida y feliz.*

*A Delfina, Nora, Gloria, Maguolia, Linda, Ricardo y Hugo, mis íos, por aguantarme, por las tareas, las lecciones de todo, por su cariño, por hacerme su cómplice y chaperona, por la niñez llena de aventuras.*

*A Jorge y Verónica amigos incondicionales y compañeros en todas las batallas.*

*A Roberto por las porras y las carcajadas por el amor y la amistad del mil colores.*

*Finalmente, quiero dedicar este trabajo a Hugo Sánchez Torres, universitario modelo y amigo irremplazable. Porque no te olvido.*

### **Agradecimientos:**

*Al Dr. Anatoli K. Iatsimirski por permitirme realizar este trabajo, por su confianza, tiempo, paciencia, y a quien no tengo palabras para expresarle todo mi respeto cariño y admiración, no solo como profesor e investigador, sino como ser humano.*

*A las Profesoras Josefina Vindes Trejo y Silvia Arellano Mendoza por la revisión de este trabajo y sus valiosas aportaciones.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la E.N.P. No. 2 y a la Facultad de Química.*

*A DGAPA por el apoyo para realizar este trabajo a través del proyecto IN205393 "Velocidad y Equilibrio en Medios de Reacción Supramolecular"*

*Al Programa 127 "Formación Básica en la Investigación"*

*Al Programa Universitario de Alimentos, en especial a Paco y Ana.*

*A Blas y Margarita (Lab. 201) por el furfural y las destilaciones.*

*A Jorge y Anita (Lab 1-D) por la centrifuga.*

*A Caro Escobar, Chucho, Fina, Baldo y al Dr. David Díaz por toda su ayuda y paciencia.*

*A Carolina Godoy y Paola más que compañeras de trabajo y maestras, amigas. Gracias por compartir conmigo todas las broncas, por sus consejos y todos los detalles (por supuesto Caro por los acertados jalones de orejas).*

*A "Los Casados" Hugo y Dea, a quienes extraño mucho, por su invaluable ayuda, paciencia y por las porras, los tips, ahí por cuidar mis cinéticas hasta altas horas de la noche y .....*

*A Don Ber, Don Juan y Don Toño por las balonas.*

*Al padre Miguel Angel por la paz.*

*A mis amigos por estar en todo momento.*

*A mis profesores, aquellos que son ejemplo de excelencia.*

*Pero sobre todo a Dios por la vida, la salud y el amor.*

## **Jurado Asignado**

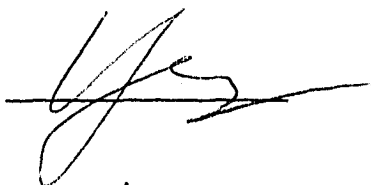
<b>Presidente:</b>	Prof. Mendoza Arellano Silvia
<b>Vocal:</b>	Prof. Viades Trejo Josefina
<b>Secretario:</b>	Prof. Iatsimirski Anatoli K.
<b>1<sup>er</sup> Suplente:</b>	Prof. Elizalde Torres Josefina
<b>2<sup>o</sup> Suplente:</b>	Prof. García Valdés José de Jesús

### **Sitio donde se desarrolló el tema:**

Lab 213. Departamento de Química Inorgánica de la División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química

### **Asesor:**

Dr. Anatoli K. Iatsimirski



### **Sustentante:**

Sofía Vania Erazo Castrejón



## Abreviaturas y Símbolos

**A** = Absorbancia

**BHT** = 2,[6]-Di-ter-Butil-*p*-cresol  
(Butilhidroxitolueno)

**CD** = Ciclodextrina

**$\alpha$ -CD** =  $\alpha$ -ciclodextrina

**$\beta$ -CD** =  $\beta$ -ciclodextrina

**$\gamma$ -CD** =  $\gamma$ -ciclodextrina

**HP- $\beta$ -CD** = Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

**cmc** = Concentración micelar crítica

**CTBA** = Bromuro de Cetiltrimetilamonio

**$\epsilon$**  = Coeficiente de absortividad molar

**$E_A$**  = Energía de activación

**EDTA** = Sal sódica del ácido etilendiamintetracético

**HPLC** = Cromatografía de líquidos de alta resolución

**$I$**  = Intensidad de la fluorescencia

**$I_{An}$**  = Índice de anisidina

**$I_P$**  = Índice de peróxidos

**$k$**  = constante de velocidad

**$K$**  = Constante de equilibrio

**$\lambda_{em}$**  = Longitud de onda de emisión

**$\lambda_{ex}$**  = Longitud de onda de excitación

**M** = molar

**mM** = milimolar

**$\mu$ M** = micromolar

**nM** = nanomolar

**MA** = Malonaldehído

**PG** = Propilgalato

**SDS** = Dodecilsulfato de sodio

**SRTBA** = Sustancias que reaccionan con  
el TBA

**TBA** = Acido 2-tiobarbitúrico

**TCA** = Acido tricloroacético

**TMT** = Producto de la condensación de  
TBA y MA

**T** = Temperatura

**$t$**  = tiempo



## **Indice**

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	1
<b>1. Introducción</b>	2
<b>2 Antecedentes</b>	
2.1 Importancia de la Determinación de Rancidez en Alimentos	5
2.2 Métodos para medir Rancidez Oxidativa	6
2.3 Método del Acido Tiobarbitúrico	10
<b>3 Objetivos</b>	16
<b>4. Metodología</b>	
4.1 Espectrofotometría	17
4.2 Fluorimetría	20
4.3 Reactivos	21
4.4 Disoluciones	21
4.5 Muestras	22
4.6 Preparación de muestras	22
4.7 Equipos	23
4.8 Mediciones	23

<b>5 Cinética de la Reacción TBA-MA</b>	<b>25</b>
5.1 Temperatura	25
5.2 Concentración de Malonaldehído (MA)	31
5.3 Concentración de TBA (TBA)	35
5.4 Concentración de Acido Perclórico (HClO <sub>4</sub> )	40
5.5 Mecanismo de la reacción TBA-MA	49
<b>6 Posibles Catalizadores</b>	<b>51</b>
6.1 Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	51
6.2 Triton-X100	55
6.3 Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTBA)	59
6.4 Anilina	61
6.5 Iones Cu <sup>2+</sup>	63
<b>7. Estudio de la Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas</b>	<b>65</b>
7.1 Ciclodextrinas	65
7.2 Efecto de las Ciclodextrinas $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, e Hidroxipropil- $\beta$ -CD en la Fluorescencia del Producto TMT	67
7.2.1 $\alpha$ -Ciclodextrina	69
7.2.2 $\beta$ -, $\gamma$ e Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrinas	72
7.3 Determinación de MA por el Método Cinético-Fluorimétrico Mejorado con HP- $\beta$ -CD	79

<b>8 Método Cinético-Fluorimétrico Propuesto para la Determinación de Malonaldehido</b>	<b>87</b>
8.1 Aplicación del Método Propuesto en Muestras de Carne	87
8.2 Comparación con el Método Espectrofotométrico Tradicional	94
<b>9 Conclusiones</b>	<b>97</b>
<b>10 Apéndices</b>	
Apéndice A	98
Apéndice B	102
<b>11 Bibliografía</b>	<b>104</b>

## Resumen

El método del ácido tiobarbitúrico es uno de los más usados para la evaluación de rancidez a través de la determinación de malonaldehído (MA) y se basa en la reacción de MA con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) a temperaturas elevadas (60-96°C). El producto de esta reacción (TMT) además de fluorecer, absorbe la luz a 532 nm y ambas propiedades se aprovechan para su determinación.

En este trabajo se estudió la cinética de la reacción de condensación del MA con TBA en el intervalo de pH de 0 a 2, a temperaturas de 25 a 60 °C, y diferentes concentraciones de TBA y MA. Con estos resultados se propuso un mecanismo de la reacción. Posteriormente, se probaron sustancias como tensoactivos, anilina y iones  $\text{Cu}^{2+}$  como posibles catalizadores, pero ninguno de ellos mostró un efecto catalizador considerable.

Se estudiaron los efectos de la  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD),  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) sobre la fluorescencia del procto TMT. Todas ellas mostraron un efecto fortalecedor en el orden  $\alpha$ - $\beta$ -HP- $\beta$ - $\gamma$ -CD, mientras que las constantes de inclusión del producto TMT disminuyeron en el orden  $\beta$ ->HP- $\beta$ -> $\gamma$ -> $\alpha$ -CD. Se encontró que la HP- $\beta$ -CD era la óptima considerando su efecto fortalecedor y la constante de inclusión, y a partir de esto se desarrolló un método cinético-fluorimétrico para la determinación de MA con una sensibilidad 0.1  $\mu\text{M}$  a temperatura ambiente. El método desarrollado se probó en carne de res y chuleta ahumada de puerco encontrándose un porcentaje de recuperación entre el 60 y 100%, los resultados en general estuvieron de acuerdo con la determinación espectrofotométrica tradicional.



## 1. Introducción

### 1. Introducción

La química supramolecular es un campo de la ciencia, producto de la interacción de varias disciplinas, que abarca los aspectos químicos, físicos y biológicos de las especies químicas más complejas que las moléculas, estas especies químicas se mantienen unidas y organizadas por medio de interacciones enlazantes de naturaleza no covalente y de tipo intermolecular.

El término Enlace Intermolecular se refiere al apareamiento de iones (electrostático), interacciones hidrofóbicas y solvofóbicas, puentes de hidrógeno, pi-stacking, e interacciones Van der Waals. (Lehn J.-M., 1995).

Las raíces de la química supramolecular se extienden sobre la química orgánica y los procedimientos de síntesis para la construcción de receptores, en la química de coordinación y los complejos ion metálico-ligando, en la fisicoquímica y los estudios experimentales y teóricos de interacciones, y en la bioquímica y procesos biológicos cuya base es el enlace a un sustrato y el reconocimiento molecular.

El reconocimiento molecular implica el almacenamiento (nivel molecular) y la recuperación de información estructural de las moléculas (nivel supramolecular). Se han estudiado, muchos tipos de receptores tales como éteres corona, criptandos, esferandos, cavitandos, calixarenos, ciclofanos, criptofandos, ciclodextrinas, entre otros. Es común utilizar los términos huésped y anfitrión para designar a los componentes de una interacción supramolecular en donde un anfitrión o receptor es un macrociclo y su huésped una especie pequeña que se introduce en su cavidad. Esta terminología es equivalente a una más antigua que trata este tipo de interacción como un proceso de inclusión.



## **1. Introducción**

Por otro lado, la combinación del reconocimiento molecular con las funciones reactivas, genera reactivos y catalizadores supramoleculares que operan en procesos de dos etapas principales: Reconocimiento del sustrato y su transformación en productos. Otros receptores modificados actúan como acarreadores para el transporte selectivo de diferentes sustratos a través de membranas artificiales o biológicas.

Así, el reconocimiento molecular, la reactividad y el transporte, representan las tres características básicas de la química supramolecular, y el diseño de entidades supramoleculares de actividad sumamente específica es una línea de investigación y desarrollo con grandes expectativas y un sin número de aplicaciones en diferentes áreas de la ciencia (Lehn J.-M., 1993).

La química supramolecular puede dividirse en dos áreas: 1) supermoléculas, bien definidas, especies oligomoleculares discretas que resultan de la asociación intermolecular de algunos componentes (receptor y su sustrato) siguiendo un esquema basado en los principios del reconocimiento intermolecular; 2) uniones supramoleculares, entidades polimoleculares que resultan de la asociación espontánea de un largo e indefinido número de componentes dentro de una fase específica teniendo una organización microscópica más o menos bien definida y características macroscópicas dependientes de su naturaleza por ejemplo en lo referente a estructura, pueden presentarse capas, membranas, vesículas, micelas, fases mesomórficas, estructuras en estado sólido, etc. (Lehn J.-M., 1995).

Las ciclodextrinas son sustancias comúnmente usadas en sistemas supramoleculares y fueron las primeras moléculas receptoras cuyas propiedades enlazantes hacia moléculas orgánicas fueron reconocidas y ampliamente estudiadas, dando una amplia gama de resultados en aspectos físicos y químicos de la complejación molecular. Así, muchas investigaciones sobre el enlace a un sustrato (Bender y Komiyama, 1978) se han realizado con ciclodextrinas naturales o sustituidas con el objeto de desarrollar enzimas artificiales para procesos biomiméticos.



## 1. Introducción

En este trabajo las ciclodextrinas se emplearon como un medio fortalecedor de la fluorescencia del producto de la reacción entre malonaldehído (MA) y el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). El efecto de fortalecimiento de la fluorescencia se logra gracias a la formación de un sistema supramolecular constituido por el TMT y las ciclodextrinas, que en este caso fueron la  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.



## **2. Antecedentes**

### **2 Antecedentes**

#### **2.1 Importancia de la Determinación de Rancidez en Alimentos.**

Las grasas y los aceites pueden sufrir diferentes transformaciones que además de reducir el valor nutritivo del alimento producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables; haciéndolo inaceptable para el consumidor, esto se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química y enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación. El grado de deterioro depende del tipo de grasa o aceite, sin embargo, los más sensibles son generalmente los de origen marino, seguidos por los aceites vegetales y finalmente por las grasas animales.

El término rancidez se usa para describir los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos y se ha dividido en dos grupos: lipólisis o rancidez hidrolítica y autooxidación o rancidez oxidativa; la primera se genera cuando las lipasas liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos, mientras que la segunda se refiere a la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos (Badui, 1993).

La oxidación de lípidos es una de las mayores causas del deterioro de alimentos y por ello es de gran importancia económica para la industria alimentaria. Sin embargo, en otros casos, esta puede ser indispensable para obtener el desarrollo de olor y sabor característicos de algunos alimentos, tal es el caso de los quesos madurados en los que una oxidación parcial y controlada de lípidos les confiere características sensoriales muy complejas y difíciles de obtener por otros medios (Fennema, 1985).

Los productos primarios de la reacción de lípidos con el oxígeno del aire son hidroperóxidos. Estos son inestables y su descomposición produce diversos productos como carbonilos, alcoholes y ésteres con propiedades (olor y sabor) desagradables. Además, se





## **2. Antecedentes**

ha encontrado que están relacionados con enfermedades del corazón, cáncer y envejecimiento en animales (Chio y Tapel, 1969).

Por todo esto es importante poder evaluar la extensión de la oxidación lipídica en alimentos. Existen varios métodos que determinan características de las grasas y aceites o la concentración de algunos compuestos que pueden variar con el grado de oxidación de los lípidos.

### **2.2 Métodos para Medir Rancidez Oxidativa.**

La oxidación de lípidos es un proceso sumamente complejo y hay muchas formas de medir la extensión de los cambios que ocurren en los alimentos debidos a ella. Los parámetros usados para medirla se dividen en primarios y secundarios. Los primeros incluyen: demanda de oxígeno, pérdida de ácidos grasos poli-insaturados y formación de hidroperóxidos. En el segundo grupo están: formación de carbonilos (determinados como dinitrofenilhidrazonas o por cromatografía de gases); formación de malonaldehído (prueba del ácido tiobarbitúrico); formación de hidrocarburos como pentano (Gray y Monahan, 1992; Wade y Van Rij, 1985) y la formación de productos fluorescentes (estructuras 1-amino-3-iminopropeno) (Gray y Monahan, 1992; Kamarei y Karei, 1984).

En situaciones donde la oxidación ocurre aceleradamente como en las carnes cocidas en que los productos primarios se descomponen rápidamente a productos secundarios estables es más apropiado considerar estos últimos como un índice de la oxidación de lípidos (Gray y Monahan, 1992).



## **2. Antecedentes**

### **Índice de Peróxidos (IP)**

Los peróxidos pueden ser medidos por técnicas basadas en su habilidad para liberar yodo a partir de yoduro de potasio, o para oxidar los iones ferroso a férrico. Su contenido se expresa usualmente en términos de miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de grasa. Se han desarrollado diferentes métodos para evaluar el Índice de peróxidos con el fin de aumentar su exactitud, pero en general resultan muy empíricos y debido a que los peróxidos están sujetos a reacciones secundarias de degradación, se limitan a las primeras etapas de la oxidación. Durante la oxidación los peróxidos alcanzan una concentración máxima que después disminuye debido a su descomposición. Este análisis es poco exacto en productos deshidratados y en aquellos que tienen un contenido bajo de lípidos (Fennema, 1985; Badul, 1993)

### **Compuestos Carbonílicos Volátiles y Totales**

Los métodos para la determinación de compuestos carbonílicos totales están basados en la medición de las hidrazonas producidas de la reacción de aldehídos y cetonas (productos de la oxidación) con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Sin embargo, en las condiciones experimentales empleadas para estas pruebas, los compuestos carbonílicos pueden ser generados por la descomposición de substratos inestables como hidroperóxidos que interfieren en los resultados. Los intentos que se han hecho para minimizar esta interferencia incluyen la reducción de hidroperóxidos a compuestos no carbonílicos antes de la determinación de carbonilos o realizar la reacción a baja temperatura.

La mayor parte de los compuestos carbonílicos de grasas oxidadas son de alto peso molecular y no contribuyen directamente al aroma y sabor del alimento, así se han desarrollado técnicas para separar y medir los compuestos carbonílicos volátiles. En la mayoría de los casos los compuestos volátiles se recuperan por destilación a presión reducida y los compuestos carbonílicos se determinan con los agentes apropiados (Fennema, 1985).



## 2. Antecedentes

### Indice de Anisidina (IAn).

En presencia de ácido acético, la *p*-anisidina reacciona con aldehídos produciendo una coloración amarillenta con un máximo de absorbancia a 350 nm. siendo esta reacción la base del Índice de anisidina.

El *IAn* se define como 100 veces la absorbancia de la solución resultante de la siguiente mezcla de reacción: 1 g de grasa o aceite en 100 mL de iso-octano y *p*-anisidina, medida a 350 nm en una celda de 10 mm de paso óptico.

La prueba determina el nivel de aldehídos, principalmente 2-alkenales. El *IAn* es particularmente útil para aceites adulterados o sometidos a tratamientos térmicos severos con bajos *IP* como los aceites de fritura (Allen y Hamilton, 1989).

### Indice Totox

A menudo el *IAn* se usa en conjunción con el *IP* para calcular el Índice total de oxidación, Índice Totox:

$$\text{IndiceTotox} = 2IP + IAn$$

El índice Totox se considera útil por combinar, en forma figurativa, el pasado y presente de la grasa o aceite. Puede usarse también en aceites tratados en condiciones drásticas u oxidados rápidamente por otras razones como por efecto de prooxidantes (Allen y Hamilton, 1989).

### Prueba de Kreis

Tiene la ventaja de ser rápida e indicar rancidez incipiente. Esta fue una de las primeras pruebas usadas para evaluar la oxidación de grasas, e incluye la producción de una coloración roja cuando el fluoroglucinol reacciona con la grasa oxidada en una solución ácida. Se dice que los compuestos responsables del color de la reacción de Kreis son



## **2. Antecedentes**

epoxialdehídos o sus acetales. Sin embargo, otros estudios (Paton, *et al.*, 1951) muestran que el malonaldehído da también color y se ha sugerido que ya que el 2,3-epoxipropanal (epihidrina) y el malonaldehído son isómeros, entonces el 2,3-epoxipropanal puede formarse por un rearrreglo del malonaldehído durante la oxidación de ciertos ácidos grasos. La prueba puede realizarse cualitativa o cuantitativamente (Fennema, 1985; Allen y Hamilton, 1989).

### **Espectrofotometría Ultravioleta**

La medición de la absorbancia a 234 nm (dienos conjugados) y 268 nm (trienos conjugados) se usa algunas veces para monitorear la oxidación. Sin embargo, la magnitud del cambio no se relaciona fácilmente con el grado de oxidación excepto en las etapas tempranas (Fennema, 1985).

### **Prueba de Oxirano**

Este método se basa en la adición de haluros de hidrógeno al grupo oxirano. El contenido de epóxido se determina por la titulación de la muestra con HBr en ácido acético, en presencia de cristal violeta, hasta llegar a un color verde en el punto final. Sin embargo, la prueba es poco específica y sensible. Los haluros de hidrógeno también atacan carbonilos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados y dienoles conjugados, y esta reacción no es cuantitativa con algunos epóxidos *trans* (Fennema, 1985).

### **Índice de Yodo**

Esta prueba es una medida de los dobles y triples enlaces en una grasa y se expresa en términos del yodo absorbido. La disminución en el índice de yodo se toma como una medida de la reducción de ácidos dienólicos durante el curso de la autooxidación (Fennema, 1985).



## 2. Antecedentes

### Fluorescencia

Algunos compuestos fluorescentes pueden desarrollarse a partir de la interacción de compuestos carbonílicos con ciertos constituyentes celulares con grupos amino libres. La detección de productos de oxidación en sistemas biológicos por métodos de fluorescencia es una técnica relativamente sensible (Fennema, 1985; Kamarei y Karel 1984).

### Análisis Sensorial

Puede hacerse un análisis sensorial para determinar si una grasa o aceite está oxidado, este debe hacerse con jueces entrenados y bajo condiciones controladas para obtener buenos resultados. A pesar de que la evaluación puede resultar muy subjetiva, hay trabajos que muestran que puede haber buena correlación entre este método y otros de tipo cuantitativo como el del TBA e *IP* (Salih *et al.* 1987; Badui, 1993; Fennema, 1985).

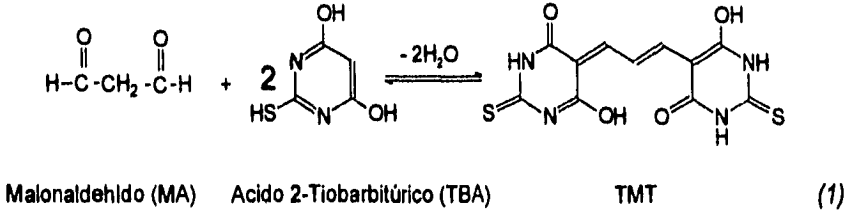
## 2.3 Método del Ácido Tiobarbitúrico

El método del ácido tiobarbitúrico, con sus diferentes variaciones, es un método ampliamente usado para medir el grado de la oxidación lipídica en carnes. El principio básico del método es la reacción del malonaldehído MA y ácido 2-tiobarbitúrico TBA para formar un aducto que puede cuantificarse espectrofotométricamente. El método puede realizarse por a) destilación del malonaldehído de la carne (Tartadgis *et al.*, 1960; Rhee, 1978; Ke *et al.*, 1984), b) calentando directamente el alimento con TBA seguido de la separación del pigmento producido (Turner *et al.*, 1954; Uchiyama y Mihara, 1978), c) haciendo reaccionar el extracto lipídico con TBA (Pikul *et al.*, 1983, 1989), y d) extraer el malonaldehído con soluciones ácidas y después hacerlo reaccionar con TBA (Witte *et al.*, 1970; Salih *et al.*, 1987)



## 2. Antecedentes

Se supone (Pegg *et al.*, 1992) que la reacción en la que se basa el método ocurre entre dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico y una de malonaldehído:



Esta ecuación muestra únicamente la relación estequiométrica de MA y TBA sin describir las especies reales ni el mecanismo a través del cual se realiza la reacción.

A pesar de que el método de destilación es el más empleado y puede verse como el método estándar de análisis de MA, es más complicado y requiere de más tiempo que el método de extracción ácida. Además, el calentamiento durante la destilación contribuye a la degradación de los hidroperóxidos de manera que se cuantifica MA adicional y otras sustancias que reaccionan con el TBA (SRTBA) que pueden formarse aún en presencia de agentes quelantes y antioxidantes (Gutteridge y Quinlan, 1983; Raharjo y Sofos, 1993). Por otro lado, muchos autores prefieren el método de extracción acuosa por su simplicidad y porque sus resultados tienen buena correlación con los del método de destilación (Pikul *et al.*, 1989) y métodos de evaluación sensorial (Salih *et al.*, 1987).

Para eliminar interferencias se han desarrollado algunas modificaciones al método por ejemplo; Bird *et al.*, (1983) usaron HPLC para cuantificar el malonaldehído. Otros trabajos emplean un paso de purificación anterior al HPLC (Draper y Hadley, 1990; Squires, 1990) o determinación espectrofotométrica (Raharjo *et al.*, 1992, 1993) usando extracción en fase



## 2. Antecedentes

sólida (cartucho  $C_{18}$ ) para eliminar sustancias de interferencia de la mezcla de reacción con lo cual lograron aumentar la sensibilidad y especificidad del método. Esto se atribuye a la concentración realizada por el cartucho de  $C_{18}$  del producto TMT después de la reacción. Sin embargo, estos procedimientos no resultan viables para análisis de rutina debido al tiempo que requieren para ejecutarse.

Nickos *et al.*, (1994) sugieren una extracción en fase acuosa con ácido tricloroacético (TCA) en presencia de hexano y butilhidrotolueno (BHT), seguida de la reacción con TBA y cuantificando después el complejo con la tercera derivada del espectro de absorción. Este procedimiento puede ser interesante pues parece mejorar la sensibilidad y especificidad del método.

Como ya se mencionó, un tipo de interferencia que presenta este método es la reacción con otros aldehídos como es el caso del formaldehído que produce un complejo con el TBA, disminuyendo el TBA disponible para la reacción con el MA cuya relación debe ser de TBA a MA  $>1000$  para el desarrollo óptimo de color (Careche y Tejada, 1987), además, si se encuentra en una concentración mayor a 25 mg/mL existe la formación de un precipitado blanco que enturbia la solución dando lecturas erróneas y que no puede eliminarse por filtración pues se ocluye en él parte del complejo TMT (Almandós *et al.*, 1986).

Dentro de este tipo de interferencias de la prueba se encuentran también las producidas por azúcares, razón por la que la prueba no es muy usada en productos ricos en estos compuestos. Para eliminarla Bramlage y Du (1992) sugieren el uso de curvas estándar para malonaldehído y sacarosa determinados con TBA. En este procedimiento, miden la absorbancia del producto de la reacción sacarosa-TBA a 440, 532 y 600 nm, mientras que la absorbancia para el TMT la registran a 532 y 600 nm. En ambos casos, la absorbancia a 600 nm sirve para corregir la absorbancia por turbidez no específica y relacionando las absorbancias a 532 y 440 nm es posible corregir la absorbancia a 532 nm para el MA.



## 2. Antecedentes

Como ya se mencionó, uno de los problemas que plantea la prueba del TGA en la modalidad de destilación, es la formación de productos de oxidación indeseados debido al calentamiento. Como una forma de disminuir este efecto, Fuchs y Fuchs (1987) emplearon la adición de antioxidantes como el propilgalato (PGA) y algunas quinonas durante el proceso de homogeneización de la muestra. Este resultó especialmente útil en el caso de muestras de pescado pues en carnes de pollo y de cerdo los resultados fueron significativamente diferentes respecto a los carnes en que no se añadieron los compuestos mencionados sobre todo en lo que se refiere al PGA.

El procedimiento básico para la prueba del TGA en la modalidad de destilación (Packard 1988) es el siguiente: 2 ml de muestra se colocan en un tubo de ensayo de 20 ml que se añade a 2 ml del extracto de la muestra. La muestra se calienta en un baño de agua hirviendo por 15 min. Después se centrifuga a 15000 rpm por 15 min. El sobrenadante se extrae y se coloca en un tubo de ensayo de 20 ml. Este procedimiento se repite 3 veces más para extraer el resto de la muestra. Después se mezcla el sobrenadante con el resto de la muestra y se coloca en un tubo de ensayo de 20 ml. Este procedimiento se repite 3 veces más para extraer el resto de la muestra. Después se mezcla el sobrenadante con el resto de la muestra y se coloca en un tubo de ensayo de 20 ml. Este procedimiento se repite 3 veces más para extraer el resto de la muestra.

Para muestras de carne, Fuchs y Fuchs (1987) emplearon el siguiente procedimiento de extracción: 10 g de muestra se colocan en un tubo de ensayo de 20 ml que se añade a 2 ml del extracto de la muestra. La muestra se calienta en un baño de agua hirviendo por 15 min. Después se centrifuga a 15000 rpm por 15 min. El sobrenadante se extrae y se coloca en un tubo de ensayo de 20 ml. Este procedimiento se repite 3 veces más para extraer el resto de la muestra. Después se mezcla el sobrenadante con el resto de la muestra y se coloca en un tubo de ensayo de 20 ml. Este procedimiento se repite 3 veces más para extraer el resto de la muestra.





## 2. Antecedentes

Como ya se mencionó, uno de los problemas que presenta la prueba del TBA en la modalidad de destilación, es la formación de productos de oxidación adicionales, debidos al calentamiento. Como una forma de disminuir este efecto Tomás y Funes (1987), sugieren la adición de antioxidantes como el propilgalato (PG) y agentes quelantes como el EDTA durante el proceso de homogeneización de la muestra. Esto resultó especialmente efectivo en el caso de muestras de pescado pues en carnes de puerco y de res, los resultados no fueron significativamente diferentes respecto a los casos en que no se añadieron los compuestos mencionados sobre todo en lo que se refiere al PG.

El procedimiento básico para la prueba del ácido tiobarbitúrico empleado por Heath y Packer (1968) es el siguiente: 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y 1 mL de TBA al 0.67% se añaden a 2 mL del extracto de la muestra. La mezcla se calienta en un baño de agua hirviendo por 15 min, después es enfriada rápidamente con agua corriente, y se centrifuga a 15000 rpm por 15 min. El sobrenadante se afora a 10 mL con agua destilada y se lee la absorbancia a 532 nm. Este procedimiento se empleó en un estudio realizado en plantas, para lo que 10 g del tejido a analizar se homogeneizaron con 50 mL de acetona fría; filtrando después en papel Whatman No. 4. El filtrado se lleva a 75 mL con agua destilada, y este extracto es el que se hace reaccionar.

Para muestras de carne, Raharjo *et al.*, (1992) emplean la siguiente técnica para la preparación de la muestra: 10 g de carne se homogeneizan con 40 mL de TCA al 5% por 1 min, añadiendo antes 15% de BHT en base al contenido de grasa de la muestra. El homogeneizado se centrifuga a 10 000g por 5 min. El sobrenadante se decanta y se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman grado C en un matraz volumétrico de 50 mL aforando después con TCA al 5%. Entonces 2 mL del filtrado se hacen raccionar con 2 mL de solución de TBA cuya concentración óptima según sus resultados es de 80 mM con incubación por 5 min a 94°C.



## 2. Antecedentes

La curva estándar de calibración se prepara disolviendo 24.6 mg de bis(dimetilacetalmalonaldehído) en 100 mL de agua destilada y desionizada. Diluyendo esta solución con ácido clorhídrico 0.01 M se obtienen diferentes concentraciones para la curva estándar (Du y Bramlage., 1992).

El coeficiente de absortividad molar del TMT publicado por Du y Bramlage (1992) es de  $1.61 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y estos autores citan otro trabajo en el cual se reporta un coeficiente de absortividad molar de  $1.57 \times 10^5$  (Albro *et al.*, 1986) que permite detectar aproximadamente una concentración 0.3  $\mu\text{M}$  del producto por espectrofotometría. Sin embargo, el método se considera poco sensible (Raharjo *et al.*, 1992).

Al mismo tiempo, el TMT es una sustancia fluorogénica de tal manera, que es posible conocer su concentración fluorimétricamente (Yagi y Yaki, 1982). Se conoce que la sensibilidad en fluorescencia normalmente es mucho mayor que en espectrofotometría. Sin embargo, los métodos para la prueba del TBA con detección fluorimétrica muestran una sensibilidad de 0.1  $\mu\text{M}$  (Yagi, 1984; Richard *et al.*, 1992; Ikatsu *et al.*, 1992; Wasowicz *et al.*, 1993), es decir tienen una sensibilidad del mismo orden que los métodos espectrofotométricos.

Recientemente se publicó un método cinético-fluorimétrico para determinar MA (Espinosa-Mansilla *et al.*, 1996) con una sensibilidad muy elevada; el límite de detección determinado en este trabajo es 1.1 ng/mL, que es equivalente a 0.015  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, las razones de esta elevada sensibilidad no quedan claras y tampoco son discutidas por los autores.

El mismo trabajo reportó los primeros y muy limitados datos acerca de la cinética de reacción entre el MA y TBA. La cinética fue caracterizada con una constante de velocidad de segundo orden y una energía de activación de 10.9 kcal/mol.



## **2. Antecedentes**

Como será mostrado más adelante (Capítulo 5), la cinética es más complicada y no obedece la ley de segundo orden. Ninguna de las conclusiones sobre el mecanismo de reacción se hicieron con base a los datos publicados en la referencia.

Vale la pena mencionar que procesos de condensación en medio acuoso, a los cuales pertenece la reacción (1), normalmente son reversibles (Jencks, 1987). Si es así, la sensibilidad del método podría aumentarse en condiciones que desplazaran el equilibrio de la reacción a la derecha. Sin embargo, la reacción (1) no ha sido bien caracterizada en términos de su cinética y equilibrio, de manera que no es posible proponer un mecanismo para la reacción, ni buscar condiciones experimentales adecuadas para mejorar las características analíticas del método.



### **3. Objectives**

## **3 Objetivos**

Del capítulo anterior tenemos que:

-No hay estudios detallados sobre la cinética de la reacción TBA y MA, tampoco estudios que puedan establecer su reversibilidad o elucidar el mecanismo a través del cual se lleva a cabo.

-Uno de los principales inconvenientes del método es su falta de sensibilidad, a pesar de que se han hecho esfuerzos por mejorarla; las modificaciones llevan a métodos complicados, y muy tardados lo que hace difícil su aplicación en muestras grandes.

-Por otro lado, el tiempo y la temperatura de incubación, en varios de los métodos reportados son muy altos y resultaría muy conveniente tener un método cuyas condiciones fueran menos drásticas además de ser más sensible.

Así, los objetivos de este trabajo son:

√ Estudiar la cinética de la reacción TBA-MA.

√ Buscar un catalizador adecuado que permita disminuir la temperatura y el tiempo de la determinación.

√ Estudiar la posibilidad de mejorar la sensibilidad de la determinación fluorimétrica del TMT utilizando ciclodextrinas como un medio de aumentar o fortalecer su fluorescencia.



## 4 Metodología

El producto de la reacción TBA-MA fue detectado por espectrofotometría y fluorimetría.

### 4.1 Espectrofotometría

Las técnicas fotométricas están basadas en la capacidad que tienen las sustancias de interactuar con la radiación electromagnética. Puesto que cada especie aislada de ion, átomo o molécula exhibe un conjunto de niveles de energía definidos, absorberá sólo las frecuencias electromagnéticas que corresponden a la excitación de un electrón de un nivel energético a otro.

Cuando una onda electromagnética de longitud de onda definida incide sobre una sustancia, se registra cierta pérdida de poder radiante,  $P$ . Esta pérdida se debe a los fenómenos de reflexión, dispersión y absorción que se presentan mientras el haz atraviesa una muestra. De estos, la absorción es el que contribuye significativamente a la pérdida de poder radiante  $P$  que se define como la cantidad de energía transmitida en forma de radiación electromagnética por unidad de tiempo. La transmitancia  $T$  se define como la relación de poder radiante de la radiación no absorbida,  $P$ , y de la radiación incidente,  $P_0$ , de esta forma,  $T = P/P_0$ . La absorbancia  $A$  es el logaritmo decimal de la recíproca de la transmitancia.

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log \frac{P}{P_0} \quad (4.1)$$

A medida que un haz de fotones pasa a través de una sustancia absorbente, el grado de absorción con respecto a la distancia recorrida es directamente proporcional al poder del haz de fotones. La reducción del poder radiante,  $-dP$ , puede expresarse como



#### 4. Metodología

$$-\frac{dP}{dx} = kP \quad (4.2)$$

donde  $k$  es una constante de proporcionalidad característica de la sustancia absorbente y de la energía de los fotones, y  $P$  representa el poder radiante a cualquier distancia  $x$  en el medio absorbente. Reordenando y separando variables se tiene

$$-\frac{dP}{P} = -d(\ln P) = kdx \quad (4.3)$$

es decir, que la fracción del poder de radiación absorbido es proporcional al espesor del medio que atraviesa. Si  $P_0$  es el poder de radiación a  $x=0$  y que  $P$  es el poder de la radiación transmitida que emerge del medio absorbente a  $x=b$ , la ecuación (4.3) puede integrarse con respecto al total del trayecto de la radiación:

$$-\int_{P_0}^P d \ln P = k \int_0^b dx \quad (4.4)$$

$$\ln P_0 - \ln P = \ln \frac{P_0}{P} = kb \quad (4.5)$$

Esta es la Ley de Lambert que indica que para una concentración dada de absorbente, el poder radiante de la luz transmitida, que previamente se ha logrado que sea paralela plana y que entre al medio absorbente formando ángulos rectos con el plano, disminuye logarítmicamente a medida que la longitud del trayecto aumenta en forma lineal.

Por su parte, Beer determinó que, al aumentar la concentración del absorbente, se producía el mismo efecto que un aumento proporcional en la longitud del trayecto de



#### 4. Metodología

absorción de la radiación. Así, la constante de proporcionalidad  $k$  es a su vez proporcional a la concentración de soluto absorbente,

$$k = aC \quad (4.6)$$

Usando logaritmos de base 10 y combinando las ecuaciones (4.5) y (4.6) se tiene la llamada ley de Lambert-Beer

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (4.7)$$

donde:

$A$  es la absorbancia

$b$  es la longitud de la celda en cm

$c$  es la concentración en mol/L y

$\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar

Para la sustancias que siguen la ley de Beer, el coeficiente de absortividad molar  $\epsilon$  es independiente de la concentración y longitud de la trayectoria óptica, es una verdadera constante característica, determinada por la naturaleza de la sustancia absorbente en sí misma, el disolvente y por la longitud de onda de la radiación incidente (Willard *et al.*, 1981)

Una de las limitantes de este método es que en las disoluciones con concentraciones que generan absorbancias mayores a 1.5 se presentan desviaciones de la ley de Lambert-Beer.

Para el compuesto que nos ocupa se reportan máximos de absorción de 530-536 nm y un coeficiente de absortividad molar de  $1.61 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Du y Bramlage, 1992) y  $1.57 \times 10^5$  (Albro *et al.*, 1986).



#### 4. Metodología

### 3.2 Fluorimetría

Muchas sustancias tienen la capacidad de fluorescer, es decir, absorben radiación de longitudes de onda corta y luego emiten radiaciones de longitudes de onda más largas. Bajo ciertas condiciones, éstas presentan una intensidad de fluorescencia que puede relacionarse fácilmente con la concentración a través de una ecuación de la misma forma que (4.7)

$$I = iC \quad (4.8)$$

donde  $i$  es un coeficiente de proporcionalidad y  $c$  es la concentración de la sustancia fluorogénica. La ecuación (4.8) es correcta sólo cuando la absorbancia de la sustancia fluorogénica es menor que 0.05 (Harris, 1987). El coeficiente  $i$  normalmente es muy grande y el método permite detectar concentraciones del orden de  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  M, es decir, es muy sensible.

Las bases para el fenómeno de fluorescencia son, primeramente, la excitación de las especies a un nivel electrónico superior mediante la absorción de radiación electromagnética, segundo, pérdida de parte de la energía suplementaria por medio de colisiones, y tercero, radiación, después de un periodo muy corto, de menor energía de la que fue absorbida.

Los datos sobre fluorescencia del TMT se presentarán en la discusión (Capítulo 7).





## 4. Metodología

### 4.3 Reactivos

- Malonaldehído bis(dietil acetal) (Aldrich)
- Acido 2-tiobarbitúrico (Aldrich)
- Butilhidroxitolueno (2,[6]-Di-ter-Butil-*p*-cresol), BHT, (Sigma)
- Acido perclórico 70% (Mallinkrodt)
- Dodecilsulfato de sodio, SDS (Bio-Rad)
- Bromuro de Cetiltrimetilamonio, CTBA (Aldrich)
- Triton-X-100 (Aldrich)
- Cloruro de cobre (II) (Sigma)
- Anilina (Aldrich)
- $\alpha$ -ciclodextrina,  $\alpha$ -CD (AMAIZO)
- $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -CD (AMAIZO)
- $\gamma$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -CD (AMAIZO)
- Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, HP- $\beta$ -CD (AMAIZO)

Cabe mencionar que todos ellos fueron grado RA.

### 4.4 Disoluciones

#### 4.4.1 Disoluciones de Malonaldehído (MA)

Se preparó semanalmente una disolución de malonaldehído bis(dietil acetal) 3 mM, a partir de esta se prepararon diariamente las soluciones de trabajo, en todos los casos el disolvente fue ácido perclórico 0.1 M preparado a partir de ácido perclórico al 70%. Se sabe que en medios ácidos el malonaldehído bis(dietil acetal) se hidroliza para formar MA.



## **4. Metodología**

### **4.4.2 Disoluciones de Acido 2-Tiobrabítúrico (TBA)**

Se pesó la cantidad necesaria de TBA para preparar soluciones 0.004 a 0.04 M, se transfirió a matraces volumétricos, se disolvió en agua con agitación vigorosa y calentamiento moderado y por último se aforó.

### **4.5 Muestras**

- Carne de res
- Chuleta ahumada de puerco

### **4.6 Preparación de Muestras**

En general se siguió el método de extracción empleado por Raharjo *et al.*, (1992). En ambos casos, se molió una porción de carne, de ésta se pesaron 10 g, a los que se añadió 0.02 g de BHT para evitar oxidación extra y se homogeneizó con 40 mL de ácido perclórico 0.1 M durante 1 min, luego se centrifugó a 10 000 g durante 5 min, se filtró el supernadante con papel Wathman No. 5 en matraces volumétricos de 50 mL y se aforó.

Estos extractos fueron empleados para realizar la reacción con TBA (ver Capítulo 8). En el caso de la carne de res fue necesario dejar en reposo 12 hr en refrigeración para permitir la sedimentación de proteínas que no fueron eliminadas en la filtración y antes de realizar la reacción con TBA se filtró nuevamente en papel Whatman No.1.

Las disoluciones que se emplearon en las medidas espectrofotométricas se prepararon con agua destilada, y las de fluorimetría con agua purificada con un equipo Milli-Q



#### **4. Metodología**

**Reagent Water System;** el material empleado aquí fue lavado con ácido y enjuagado con esta misma agua.

#### **4.7 Equipos**

- Espectrofotómetro HP8452A con arreglo de diodos (ventana espectral 120 nm a 820 nm, resolución de 2 nm) acoplado a un controlador de temperatura Peltier HP89090 ( $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ )
- Espectrofluorómetro Fluoromax Spex (ventana espectral de 200 nm a 800 nm) acoplado a un baño de temperatura controlada ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ )
- Procesador de Alimentos (Phillips 2 velocidades)
- Centrifuga IEC HT de Damon/IEC Division

#### **4.8 Mediciones**

Para el estudio de la cinética de la reacción TBA-MA las soluciones de TBA y MA se estabilizaron por separado a la temperatura de trabajo (generalmente  $50^{\circ}\text{C}$ ), se mezclaron y la mezcla se transfirió rápidamente a la celda, y se siguió la reacción midiendo la absorbancia del producto a 532 nm. En los casos en que fue necesario, se hicieron ajustes en las concentraciones de los reactivos principales para introducir las otras sustancias con que se trabajó como SDS, CTBA, Triton-X-100, anilina y  $\text{Cu}^{2+}$ .

Para la parte cinética de fluorimetría en presencia de ciclodextrinas, se solubilizó una cantidad pesada de la ciclodextrina en la solución de TBA directamente en la celda, después se añadió la solución de MA, y se siguió la reacción a temperatura ambiente registrando la intensidad de la luz emitida por el producto TMT a 548 nm.



#### **4. Metodología**

**Para los estudios del efecto de ciclodextrinas sobre la fluorescencia del TMT, se prepararon soluciones del producto (obtenido por incubación en un baño de agua hirviendo por 15 min y posterior enfriamiento en agua con hielo) en ácido perclórico 0.1 M, con estas soluciones se disolvió directamente en la celda la ciclodextrina y luego se midió la intensidad a 548 nm.**



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

### 5 Cinética de la Reacción TBA-MA

Como se mencionó en los antecedentes (ver página. 14), los datos sobre la cinética y equilibrio de la reacción TBA-MA que se encontraron en la literatura son muy escasos e incompletos, lo cual nos llevó a hacer una investigación más detallada sobre estos puntos. En nuestro estudio se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- Temperatura
- Concentración de malonaldehído (MA)
- Concentración de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)
- Concentración de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ )

#### 5.1 Temperatura

Para estudiar el efecto de la temperatura en el desarrollo de la reacción se fijaron las concentraciones de los reactivos en la celda:

$$[\text{MA}] = 2 \mu\text{M}$$

$$[\text{TBA}] = 0.015 \text{ M}$$

$$[\text{HClO}_4] = 0.05 \text{ M}$$

Las soluciones de MA diluido en ácido perclórico y TBA se estabilizaron por separado a las temperaturas de trabajo, luego se mezclaron y la mezcla de reacción se vertió en una celda de cuarzo. La absorbancia del producto a 532 nm se registró durante 40 minutos. Las temperaturas fueron: 35, 40, 50, 55 y 60 °C.

En la figura 5.1 se muestran las curvas cinéticas obtenidas. En estas puede observarse que hay un periodo inicial en el que no se registra aumento en la absorbancia a



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

532 nm lo cual puede indicar que en este periodo aún no existe el producto TMT. Una interpretación de esto puede ser que en el inicio de la reacción se forma un intermediario incoloro que no presenta absorbancia a 532 nm, este intermediario puede estar formado por una molécula de TBA y una de MA, a continuación se adiciona la segunda molécula de TBA dando lugar al producto de color rosado con absorbancia a 532 nm, que se manifiesta en el aumento de la absorbancia a esta longitud de onda.

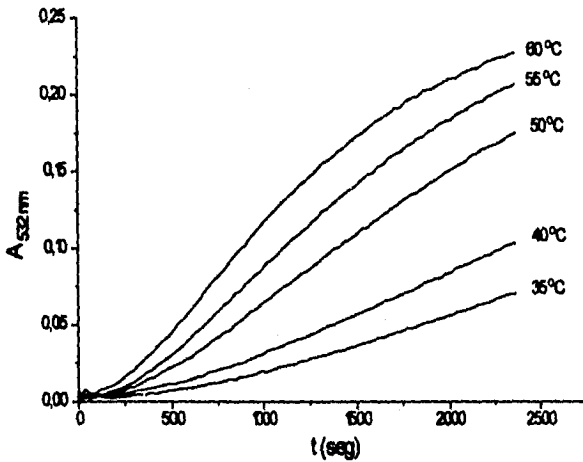
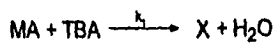


Figura 5.1. Avance de la reacción TBA-MA a diferentes temperaturas. [MA]=2  $\mu$ M, [TBA]=0.015 M, [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M

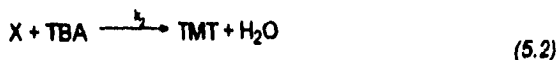
Tomando en cuenta lo anterior puede proponerse el mecanismo siguiente para la reacción TBA-MA.



(5.1)



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA



En estas ecuaciones X representa al intermediario incoloro y TMT es el producto final con un máximo de absorbancia a 532 nm.

Del modelo representado por las ecuaciones (5.1) y (5.2) se deriva la ecuación (ver Apéndice A):

$$A = \epsilon [MA]_0 \left\{ 1 - \left[ \frac{k'_1 e^{-k'_2 t} - k'_2 e^{-k'_1 t}}{k'_1 - k'_2} \right] \right\} \quad (5.3)$$

donde:

$\epsilon$ =coeficiente de absortividad molar del producto final

$[MA]_0$ =concentración de MA inicial

A=absorbancia

$k'_1$ =constante de velocidad de pseudo primer orden de la primera etapa

$k'_2$ =constante de velocidad de pseudo primer orden de la segunda etapa

Cabe mencionar que el parámetro  $\epsilon[MA]_0$ , absorbancia infinita, es prporcional a la concentración final de TMT.

Las constantes  $k'_1$  y  $k'_2$  incluyen la concentración de TBA, esta se considera una constante porque es mucho mayor que la [TBA] necesaria para que reaccione todo el MA y por ello prácticamente no cambia a lo largo de la reacción. Así, las ecuaciones (5.1) y (5.2) de segundo orden se transforman en ecuaciones de pseudoprimer orden.



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

Con la ecuación (5.3) se ajustaron las curvas cinéticas de cada temperatura y en todos los casos se obtuvieron buenos ajustes que corroboran el mecanismo propuesto. En este caso, como en el resto del estudio cinético, en el ajuste de las curvas se aplicó un modelo de regresión no lineal de mínimos cuadrados a través del programa *Curve Fit*. Un ejemplo del ajuste se muestra en la figura 5.2.

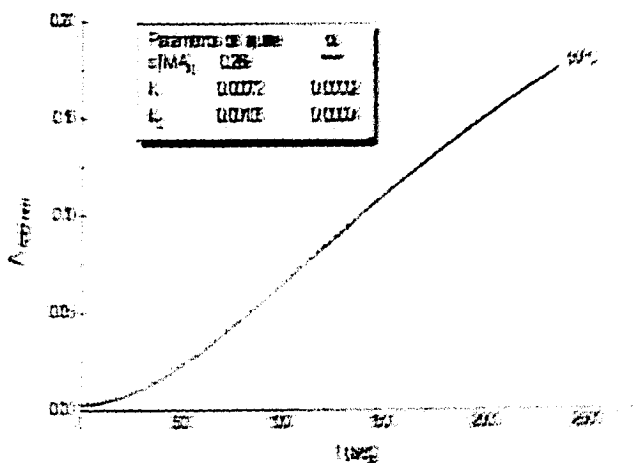


Figura 5.2. Ajuste con la ecuación (5.3) de la curva a 50°C presentada en la figura 5.1. Los parámetros de ajuste son los registros de absorción a 522 nm en las tres columnas y el ajuste.





## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

Con la ecuación (5.3) se ajustaron las curvas cinéticas de cada temperatura y en todos los casos se obtuvieron buenos ajustes que corroboran el mecanismo propuesto. En este caso, como en el resto del estudio cinético, en el ajuste de las curvas se empleó un modelo de regresión no lineal de mínimos cuadrados a través del programa Origin 3.5. Un ejemplo del ajuste se muestra en la figura 5.2.

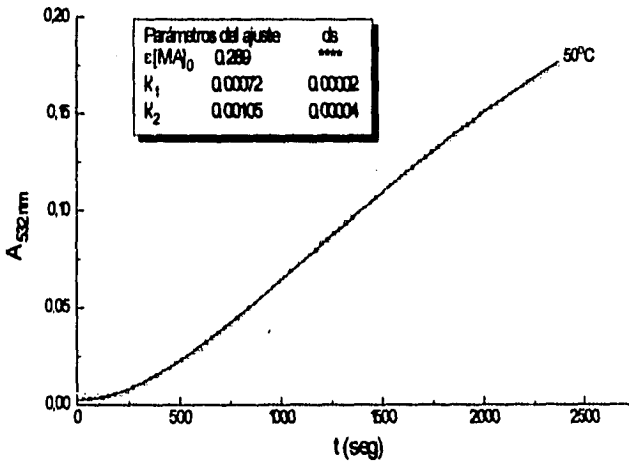


Figura 5.2. Ajuste con la ecuación (5.3) de la curva a 50°C presentada en la figura 5.1. Los puntos son los registros de absorbancia a 532 nm y la línea continua es el ajuste.



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

Tabla V.1. Absorbancia infinita y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA a diferentes temperaturas. [MA]=2  $\mu$ M, [TBA]=0.015, [HClO<sub>4</sub>]=0.05. Durante el ajuste, el parámetro  $\epsilon$ [MA]<sub>0</sub> se fijó a su valor calculado con  $\epsilon=1.44 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Temperatura °C	$\epsilon$ [MA] <sub>0</sub>	$k_1 \times 10^3 \pm ds$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^3 \pm ds$ (s <sup>-1</sup> )
35	0.289	3.2 ± 0.3	4.9 ± 0.6
40	0.289	4.2 ± 0.2	6.6 ± 0.4
50	0.289	7.2 ± 0.2	10.5 ± 0.4
55	0.289	8.0 ± 0.08	15.8 ± 0.3
60	0.289	8.2 ± 0.07	27.3 ± 0.7

Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  a diferentes temperaturas se muestran en la tabla V.1. Como era de esperarse, ambas constantes aumentan con la temperatura. En la figura 5.3 se presentan los valores de  $k_1$  y  $k_2$  en función de las coordenadas de la ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (5.4)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT} \quad (5.5)$$



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

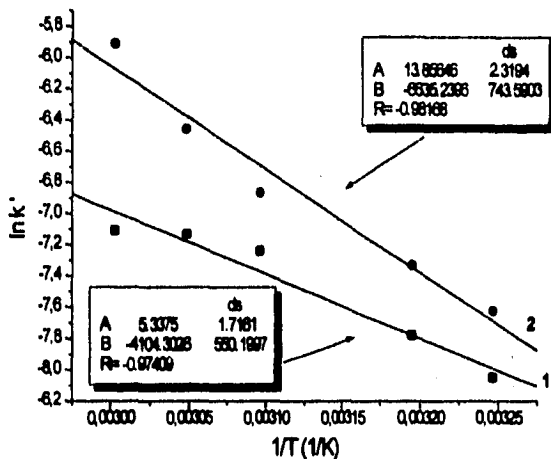


Figura 5.3. Gráfica  $\ln k'$  vs  $1/T$  de la ecuación de Arrhenius. La línea 1 corresponde a  $\ln k'_1$  y 2 a  $\ln k'_2$

Con las pendientes de las rectas se calculó la energía de activación para cada etapa, encontrando que en la primera la energía de activación,  $E_{A1}$ , es  $13.0 \pm 1.5$  kcal/mol y para la segunda etapa,  $E_{A2}$  es  $8.0 \pm 1.0$  kcal/mol.

Estos valores de energía de activación pueden compararse con  $E_A=10.9$  kcal/mol, obtenida por Espinosa-Mansilla *et al.* (1996) de la dependencia de la velocidad de la reacción de la temperatura sin calcular las constantes individuales de cada etapa. Seguramente el valor publicado es el promedio de los valores de  $E_A$  para  $k'_1$  y  $k'_2$ , que puede interpretarse como el resultado de que  $k'_1$  y  $k'_2$  contribuyen de manera aproximadamente



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

equitativa a la velocidad observada en las mediciones del trabajo citado; lo cual es viable si se observa que  $k'$  y  $k'_2$  son del mismo orden de magnitud.

En la figura V.3 puede observarse que el  $\ln k'$  respecto a  $1/T$  pudiera no tener una tendencia lineal definida lo cual indicaría que  $\Delta C_p^*$  que se considera como cero para la deducción de la ecuación de Arrhenius no lo sea. Por ello se intentó ajustar estos puntos con la ecuación de Valentiner (Blandamer, M. J. *et al.*, 1982) pero a pesar de que se obtuvieron buenos ajustes para  $\ln k'$ , los parámetros resultaron muy absurdos ( $\Delta C_p^* \geq 600$  cal/mol K, mientras que los valores más grandes de  $\Delta C_p^*$  aceptados para los procesos parecidos a este son  $\leq 150$  cal/mol K) y se decidió conservar el modelo de Arrhenius. De esta manera, la curvatura que se observa puede deberse a errores de tipo experimental o a que las etapas de la reacción que se consideraron elementales no lo sean.

### 5.2 Concentración de Malonaldehído (MA)

En esta parte se estudió el efecto de la concentración de MA en el avance de la reacción manteniendo el exceso de TBA. El procedimiento que se siguió es el mismo que en la parte de temperatura y las concentraciones en la celda fueron:

$$[\text{MA}] = 1, 3, 6 \text{ y } 10 \mu\text{M}$$

$$[\text{TBA}] = 0.04 \text{ M}$$

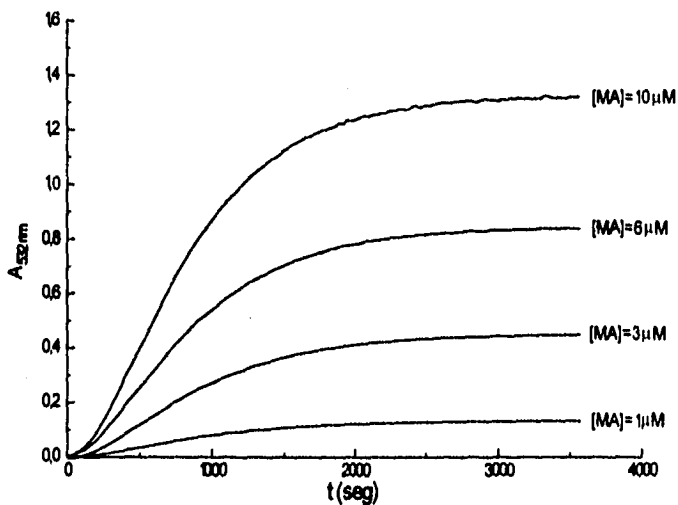
$$[\text{HClO}_4] = 0.05 \text{ M}$$

Las reacciones se siguieron durante una hora a  $50^\circ\text{C}$ . Se decidió realizar el resto del estudio a esta temperatura ya que permitía seguir la reacción en un intervalo de tiempo tolerable para lograr la conversión total de MA a TMT sin forzar demasiado el equipo.



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

En la **figura 5.4** se muestran las curvas de las cinéticas para cada concentración de MA y un ejemplo del ajuste con la ecuación (5.3) puede observarse en la **figura 5.5**. Por otro lado, los valores de  $c[MA]_0$ ,  $k'_1$  y  $k'_2$  para cada curva se resumen en la **tabla V.2** y **figura 5.6**.



**Figura 5.4.** Curvas cinéticas de la reacción TBA-MA con diferentes concentraciones de MA.  $[TBA]=0.04 M$ ,  $[HClO_4]=0.05 M$ ,  $T=50^\circ C$ .



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

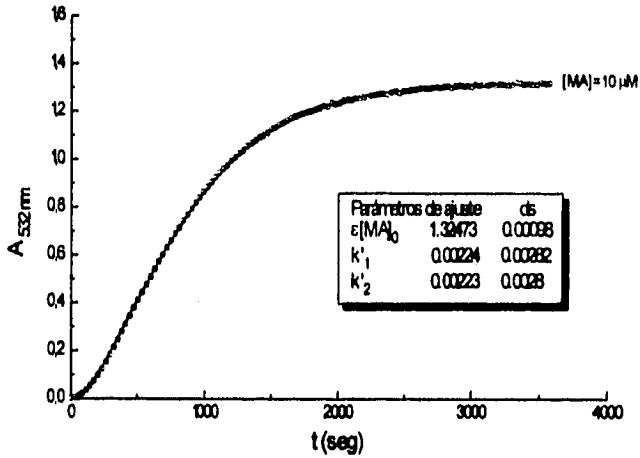


Figura 5.5. Ajuste de la curva con MA 10  $\mu\text{M}$ . Los puntos son los registros de absorbancia a 532 nm y la línea el ajuste con (5.3)

Tabla V.2. Absorbancia infinita y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA con diferentes concentraciones de MA a 50°C.

[MA] ( $\mu\text{M}$ )	$c[MA]_0 \pm ds$	$k'_1 \times 10^3 \pm ds$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k'_2 \times 10^3 \pm ds$ ( $\text{s}^{-1}$ )
1	$0.1367 \pm 0.0001$	$2.71 \pm 0.05$	$1.66 \pm 0.02$
3	$0.4520 \pm 0.0005$	$2.20 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.13$
6	$0.8447 \pm 0.0003$	$2.87 \pm 0.03$	$1.75 \pm 0.01$
10	$1.3247 \pm 0.001$	$2.0 \pm 2.0^*$	$2.0 \pm 2.0^*$

\*El error tan grande en las constantes se debe al hecho de que  $k'_1 \approx k'_2$  por lo que en la ecuación (5.3) se produce una indefinición del tipo 0/0.



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

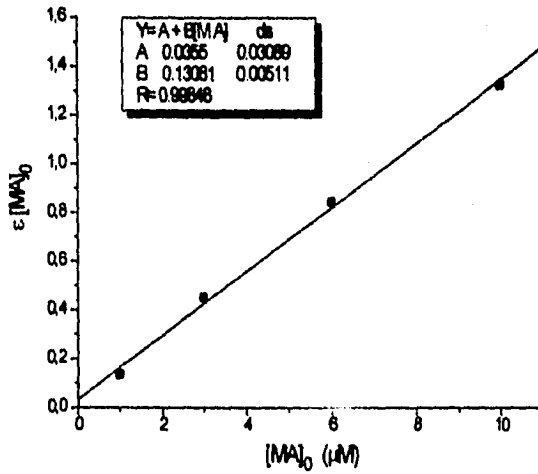


Figura 5.6. Relación entre la absorbancia infinita y la concentración inicial de MA.

En la última gráfica podemos observar que la absorbancia infinita depende en forma directamente proporcional de la concentración inicial de malonaldehído,  $[MA]_0$ , mientras que  $k'_1$  y  $k'_2$ , dentro de los límites de su error, no dependen de este factor, **tabla V.2**, lo que comprueba el primer orden cinético respecto al MA de ambas etapas de la reacción.



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

### 5.3 Concentración de Acido Tiobarbitúrico (TBA)

En esta parte se varió la concentración de TBA y el resto de las condiciones fueron las seleccionadas en los experimentos anteriores:

$$[MA]=10 \mu\text{M}$$

$$[\text{HClO}_4]=0.05 \text{ M}$$

$$[\text{TBA}] \text{ de } 0.004 \text{ a } 0.04 \text{ M}$$

y una temperatura de trabajo de  $50^\circ\text{C}$ .

La figura 5.7 muestra las curvas cinéticas obtenidas en estas condiciones. Todas ellas se ajustaron bien con la ecuación (5.3) (ejemplo de ajuste figura 5.6) y los parámetros calculados están en la tabla V.3.

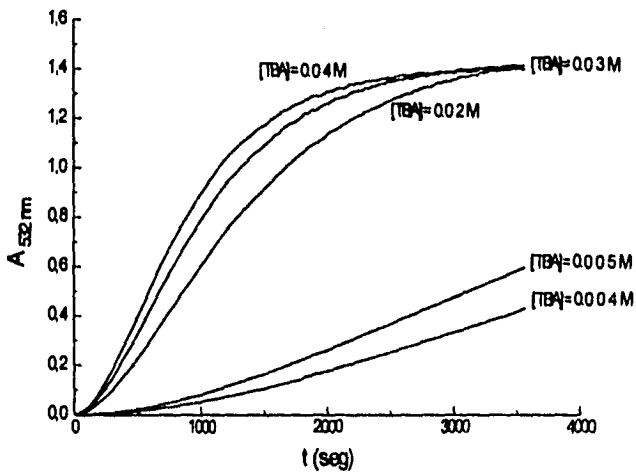


Figura 5.7. Cinéticas de la reacción TBA-MA a  $50^\circ\text{C}$  con diferentes concentraciones de TBA.  $[MA]=10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{HClO}_4]=0.05 \text{ M}$ .





### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

Tabla V.3. Absorbancia infinita y constantes para la reacción TBA-MA a 50°C con diferentes concentraciones de TBA.  $[MA]=10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{HClO}_4]=0.05 \text{ M}$

[TBA] (M)	$\epsilon[MA]_0 \pm ds$	$k'_1 \times 10^3 \pm ds$ (s <sup>-1</sup> )	$k'_2 \times 10^3 \pm ds$ (s <sup>-1</sup> )
0.004	1.446	$0.3 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.19$
0.005	1.448	$0.46 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.02$
0.02	1.479	$1.0 \pm 2.0$	$1.0 \pm 2.0$
0.03	1.430	$1.92 \pm 0.09$	$1.71 \pm 0.07$
0.04	1.413	$2.2 \pm 0.17$	$2.0 \pm 0.15$

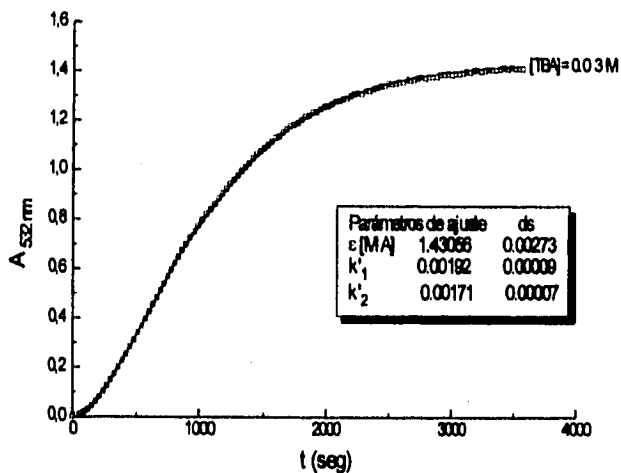


Figura 5.8. Ajuste de la curva cinética con TBA 0.03 M de la figura anterior. La línea corresponde al ajuste con (5.3) y los puntos a los datos experimentales.



En las gráficas 5.9 y 5.10 se observa claramente que  $k'_1$  y  $k'_2$  son funciones lineales de la concentración de TBA de acuerdo con las ecuaciones cinéticas (5.1) y (5.2), de manera que se verifican las siguientes ecuaciones:

$$k'_1 = k_1[TBA] \quad (5.4)$$

$$k'_2 = k_2[TBA] \quad (5.5)$$

que muestran que cada etapa de la reacción (1) es de pseudoprimer orden con respecto al TBA.

Es importante señalar que las ecuaciones (5.4) y (5.5) incluyen la concentración total de TBA y no una de sus formas individuales: TBA neutro (TBAH) o TBA anión (TBA<sup>-</sup>). Estos resultados se obtuvieron con una concentración de HClO<sub>4</sub> fija y por esto cada una de las formas de TBA constituye una fracción constante de la concentración total, es decir, la proporcionalidad de  $k'_1$  y  $k'_2$  con [TBA] puede deberse a la interacción bimolecular de MA con cualquiera de estas formas. Esta situación será aclarada con el estudio de las dependencias de  $k'_1$  y  $k'_2$  de la concentración de ácido perclórico, [HClO<sub>4</sub>].



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

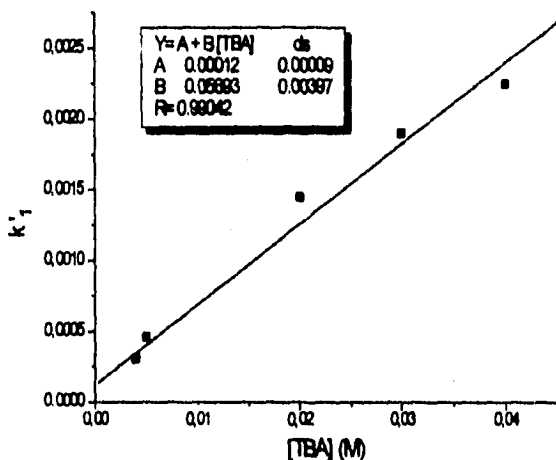


Figura 5.9. Relación  $k'$  - [TBA].

La relación entre la absorbancia final,  $\epsilon[\text{MA}]_0$ , y la concentración de TBA se muestran en la figura 5.11. Evidentemente, la absorbancia final no depende de la concentración de TBA, lo cual implica la conversión total de MA en TMT dentro del intervalo de concentraciones de TBA que aquí se emplearon. Esta conclusión está también de acuerdo con los datos cinéticos que indican la existencia de dos etapas consecutivas irreversibles, pues si se diera el caso de reversibilidad de alguna de las etapas (5.1) o (5.2), la gráfica de la constante de pseudo primer orden respectiva ( $k'_1$  o  $k'_2$ ) vs [TBA] mostraría un valor positivo de ordenada al origen, sin embargo, en ambos casos y dentro de los límites del error, la ordenada es cero. Así, cada una de las reacciones propuestas para el mecanismo de la reacción TBA-MA son de pseudoprimer orden respecto al TBA.



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

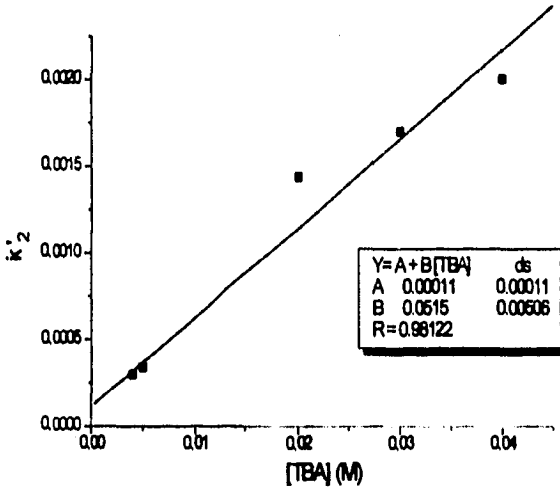


Figura 5.10. Relación  $k'_2$  - [TBA].

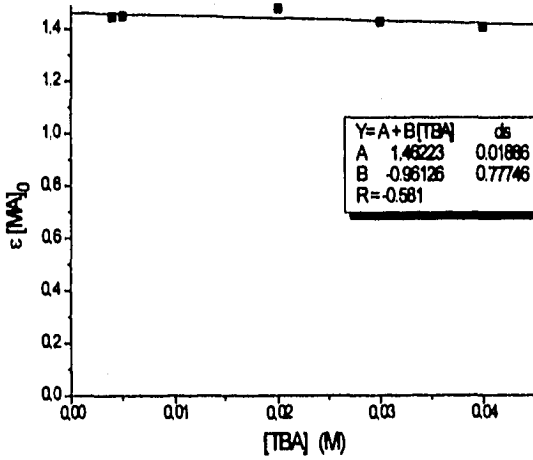


Figura 5.11. Relación  $\epsilon[MA]_0$  - [TBA].



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

### 5.4 Concentración de Acido Perclórico ( $\text{HClO}_4$ )

Aquí se probaron diferentes concentraciones de  $\text{HClO}_4$ , trabajando con:

$$[\text{MA}] = 10 \mu\text{M}$$

$$[\text{TBA}] = 0.03 \text{ M}$$

$$[\text{HClO}_4] \text{ de } 0.01 \text{ a } 1 \text{ M}$$

y una temperatura de  $50^\circ\text{C}$ .

Se conoce que los ácidos fuertes son catalizadores de la reacción (1) (Bird y Draper, 1984), pero el efecto catalítico no se ha estudiado cinéticamente. Otra razón por la cual se realizaron estos estudios en presencia de ácido perclórico es que este compuesto se emplea comúnmente en procedimientos de extracción ácida, en especial para muestras ricas en proteínas ya que tiene la capacidad de precipitarlas.

En este estudio es importante saber en que forma iónica se encuentra cada uno de los componentes de la reacción. Los valores de  $\text{pK}_a$  para MA y TBA son 4.46 y 2.25 respectivamente (Serjeant y Dempsey, 1979). esto significa que en el intervalo de acidez empleado, el MA siempre se encuentra como una especie neutra, mientras que la disociación ácida de TBA puede ser importante.

Las curvas cinéticas con variación de  $[\text{HClO}_4]$  se encuentran en la figura 5.12 y un ejemplo del ajuste en la figura 5.13. Los parámetros calculados mediante el ajuste de estas curvas con la ecuación (5.3) están en la tabla V.4.



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

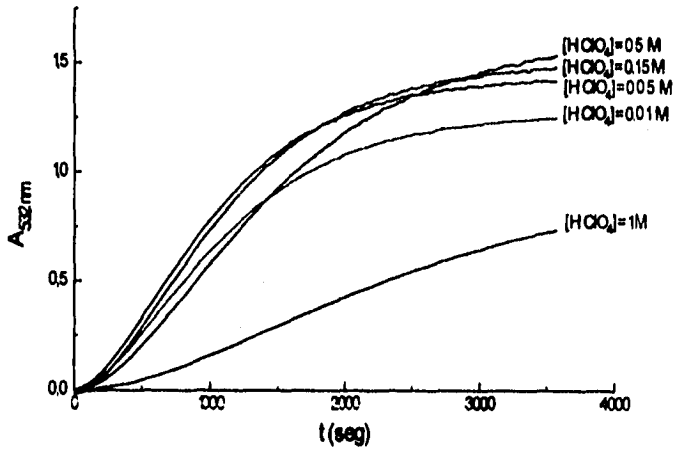


Figura 5.12. Cinéticas de la reacción TBA-MA a 50°C con diferentes concentraciones de HClO<sub>4</sub>

Tabla V.4. Absorbancia infinita y constantes para la reacción TBA-MA a 50°C con diferentes concentraciones de HClO<sub>4</sub>. [MA]=10 μM, [TBA]=0.03 M

[HClO <sub>4</sub> ] (M)	$\epsilon[MA]_0$	$k_1 \times 10^4 \pm ds$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^4 \pm ds$ (s <sup>-1</sup> )	[H <sup>+</sup> ] <sup>d)</sup> (M)	[TBA <sup>-</sup> ] <sup>b)</sup> (M)	[TBAH] <sup>c)</sup> (M)
0.01	1.266 ± 0.001	1.6 ± 0.1	1.7 ± 1.0	0.0172	0.0074	0.0226
0.05	1.433 ± 0.001	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4	0.0524	0.0029	0.0271
0.15	1.509 ± 0.004	1.7 ± 1.0 <sup>d)</sup>	1.6 ± 1.0 <sup>d)</sup>	0.151	0.00107	0.0290
0.5	1.633 ± 0.007	1.25 ± 1.0 <sup>d)</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>d)</sup>	0.50	0.00033	0.0296
1.0	1.02 ± 0.01	0.7 ± 1.0 <sup>d)</sup>	0.7 ± 1.0 <sup>d)</sup>	1.0	0.00017	0.0298

- Concentración de los cationes H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> calculada tomando en cuenta la disociación de TBA.
- Concentración del anion del TBA, calculado con su pKa y [H<sup>+</sup>].
- Concentración de la forma neutra del TBA.
- Este elevado error se debe a que los valores de  $k_1 \approx k_2$  lo cual produce indefinitividad de tipo 0/0 en la ecuación (5.3).



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

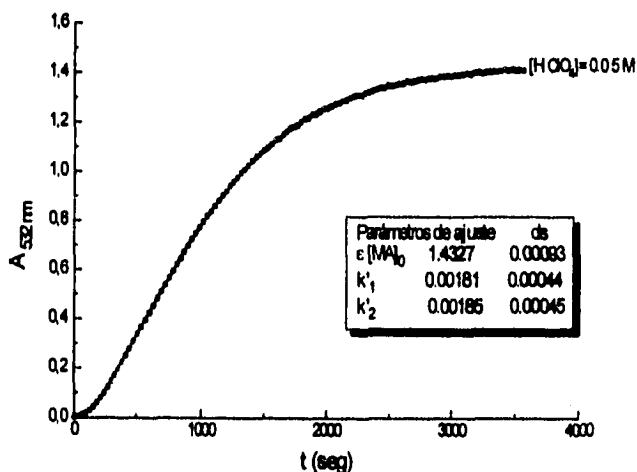


Figura 5.13. Ajuste de la curva con  $HClO_4$  0.05 M. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea al ajuste con (5.3).

La variación de  $[HClO_4]$  en el intervalo de 0.01 M a 0.5 M produjo un incremento moderado en la absorbancia final y un decremento de ambas constantes de velocidad. El ácido perclórico 1.0 M provocó en cambio, la disminución notable de todos los parámetros calculados.

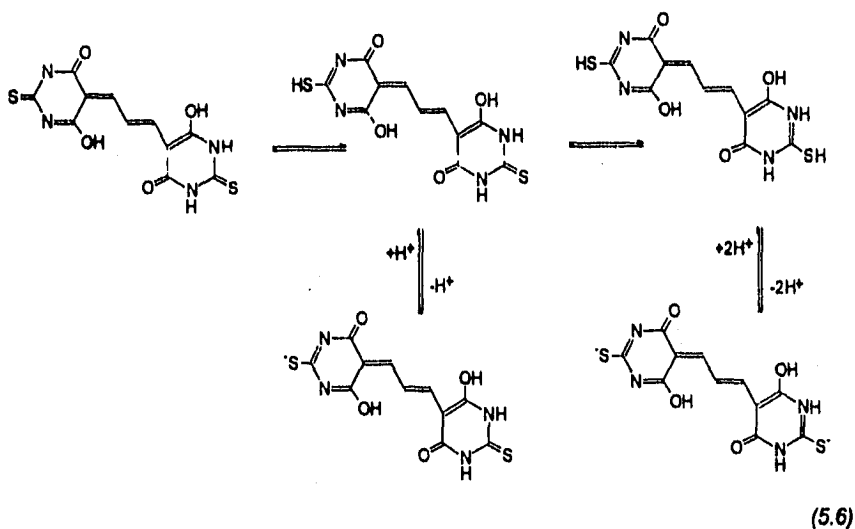
La variación de la absorbancia final,  $\epsilon[MA]_0$ , no puede atribuirse a cambios del rendimiento del TMT, porque a la concentración de TBA empleada, la reacción es prácticamente irreversible (ver la sección anterior). Es más probable que el TMT participe en algunos procesos de disociación ácido-base. En la literatura no hay ninguna información sobre estas propiedades del TMT, sin embargo, la estructura del TMT nos lleva a pensar que esta molécula puede participar en ciertos equilibrios de tipo protolítico.



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

Al parecer, el TMT no tiene grupo -SH que es el sitio con carácter ácido del TBA. Sin embargo, la estructura presentada en la reacción (1) es sólo uno de los posibles tautómeros del TMT y que se considera el más estable para la molécula neutra.

Los siguientes equilibrios tautoméricos pueden explicar la disociación ácida del TMT:



Entonces, si la forma neutra tiene el color más intenso el efecto del  $\text{HClO}_4$  en el intervalo 0.01-0.5 M puede explicarse como el desplazamiento de los equilibrios (5.6) hacia la izquierda debido al aumento de  $\text{H}_3\text{O}^+$ . De la misma forma, la disminución de la absorbancia infinita de la curva con  $\text{HClO}_4$  1 M respecto a las otras podría deberse a la





## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

presencia de las especies de TMT que se generan cuando los equilibrios (5.6) se desplazan hacia la derecha y de las cuales no tenemos la certeza de que absorban a 532 nm.

Considerando la ya mencionada y bien conocida catálisis ácida que existe en la reacción y que se manifiesta con la baja velocidad de condensación en medios cuyo pH es mayor a 3 (Bird y Draper, 1984), el efecto inhibitor del  $\text{HClO}_4$ , que se observa sobre  $k'_1$  y  $k'_2$  resulta muy extraño. Sin embargo, en la literatura no se encontraron investigaciones sobre la dependencia de la velocidad de la reacción en función de la acidez en forma cuantitativa.

El cambio de la concentración de  $\text{HClO}_4$  tiene dos consecuencias: el cambio de la concentración de iones  $\text{H}_3\text{O}^+$ , que muy probablemente es una especie catalizadora, y por otro lado, el cambio en las concentraciones de las formas neutra (TBAH) y aniónica ( $\text{TBA}^-$ ) del TBA, cada una de las cuales puede ser una especie reactiva. Las concentraciones de las tres especies a diferentes concentraciones de  $\text{HClO}_4$  añadido se presentan en la tabla V.4.

La similitud de la dependencia de las constantes  $k'_1$  y  $k'_2$  de la concentración de ácido perclórico y TBA parece lógica si recordamos que  $k'_1$  corresponde a la interacción del TBA con uno de los grupos carbonilo del MA y  $k'_2$  a la misma interacción con el segundo grupo carbonilo del MA en el intermediario X. Esto nos lleva a establecer que el tratamiento de las dependencias de  $k'_1$  y  $k'_2$  de la  $[\text{HClO}_4]$  puede ser el mismo.

Ahora, podemos escribir cuatro expresiones cinéticas para  $k'_1$  y  $k'_2$ , que son modificaciones de las ecuaciones (5.4) y (5.5) para los diferentes tipos de especies reactivas (ver sección 5.3).



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

Las rutas posibles para la reacción (1) son las siguientes:

1) Interacción no catalítica de TBAH con MA ó X:

$$k'_1 = k_1[TBAH] \quad \text{y} \quad k'_2 = k_2[TBAH] \quad (5.7)$$

2) Interacción no catalítica de TBA<sup>-</sup> con MA ó X:

$$k'_1 = k_1[TBA^-] \quad \text{y} \quad k'_2 = k_2[TBA^-] \quad (5.8)$$

3) Interacción de TBAH con MA ó X con efecto catalizador de H<sup>+</sup>:

$$k'_1 = k_1[TBAH][H^+] \quad \text{y} \quad k'_2 = k_2[TBAH][H^+] \quad (5.9)$$

4) Interacción de TBA<sup>-</sup> con MA ó X catalizada por H<sup>+</sup>:

$$k'_1 = k_1[TBA^-][H^+] \quad \text{y} \quad k'_2 = k_2[TBA^-][H^+] \quad (5.10)$$

El criterio obvio para escoger uno de estos mecanismos es la constancia de los valores de  $k_1$  y  $k_2$  calculados de acuerdo a las ecuaciones (5.7)-(5.10) y utilizando los valores de  $[H^+]$ ,  $[TBA^-]$  y  $[TBAH]$  de la **tabla V.4**. Los resultados de estos cálculos se muestran en la **tabla V.5**.



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

**Tabla V.5.** Constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  calculadas con las ecuaciones (5.7) y (5.8) a diferentes concentraciones de  $\text{HClO}_4$

[ $\text{HClO}_4$ ] (M)	Ecuación			
	(5.7)		(5.8)	
	$k_1 \pm ds$	$k_2 \pm ds$	$k_1 \pm ds$	$k_2 \pm ds$
0.01	$0.071 \pm 0.04$	$0.075 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.013$	$0.23 \pm 0.013$
0.05	$0.066 \pm 0.01$	$0.066 \pm 0.01$	$0.62 \pm 0.137$	$0.62 \pm 0.137$
0.15	$0.059 \pm 0.034$	$0.055 \pm 0.034$	$1.6 \pm 0.93$	$1.5 \pm 0.93$
0.5	$0.042 \pm 0.033$	$0.044 \pm 0.033$	$3.8 \pm 3.03$	$3.9 \pm 3.03$
1.0	$0.023 \pm 0.033$	$0.023 \pm 0.033$	$4.1 \pm 5.88$	$4.1 \pm 5.88$

Continúa

**Tabla V.5.** Constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  calculadas con las ecuaciones (5.9) y (5.10) a diferentes concentraciones de  $\text{HClO}_4$

[ $\text{HClO}_4$ ] (M)	Ecuación			
	(5.9)		(5.10)	
	$k_1 \pm ds$	$k_2 \pm ds$	$k_1 \pm ds$	$k_2 \pm ds$
0.01	$4.1 \pm 0.25$	$4.4 \pm 0.25$	$12.6 \pm 0.78$	$13.3 \pm 0.78$
0.05	$1.3 \pm 0.28$	$1.3 \pm 0.28$	$11.8 \pm 2.63$	$11.8 \pm 2.63$
0.15	$0.4 \pm 0.22$	$0.38 \pm 0.22$	$10.5 \pm 8.1$	$9.9 \pm 6.1$
0.5	$0.084 \pm 0.067$	$0.088 \pm 0.0675$	$7.6 \pm 6.06$	$7.9 \pm 6.6$
1.0	$0.023 \pm 0.033$	$0.023 \pm 0.033$	$4.1 \pm 5.88$	$4.1 \pm 5.88$

La inspección de la **tabla V.5** indica, que los mecanismos (5.8) y (5.9) pueden excluirse porque  $k_1$  y  $k_2$  varían mucho, más de 10 y 100 veces respectivamente. Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  para los mecanismos (5.7) y (5.10) tampoco son constantes pero varían únicamente en un intervalo de tres veces y considerando el error esta diferencia no es significativa además, la mayor variación se da en la constante con la concentración de  $\text{HClO}_4$  1 M que de hecho no debe tomarse en cuenta (ver página 43). La variación de las



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

constantes en los mecanismos (5.9) y (5.10) podría atribuirse al cambio de los coeficientes de actividad ( $\gamma$ ) de los componentes. De hecho, la concentración de  $\text{HClO}_4$  es elevada y los cambios de los coeficientes de actividad pueden ser notables.

Se conoce, que los efectos de electrolitos, en este caso  $\text{HClO}_4$ , sobre  $\gamma$  de especies iónicas son mucho mayores que sobre  $\gamma$  de especies neutras (W. P. Jencks, 1975). El mecanismo (5.7) incluye solamente la interacción de especies neutras, MA y TBAH, mientras que el mecanismo (5.10) incluye la interacción de una especie neutra, MA, con dos iones:  $\text{H}^+$  y  $\text{TBA}^-$ . Evidentemente, la fluctuación de los valores de  $k_1$  y  $k_2$  para el mecanismo (5.7) no puede explicarse por medio de un efecto electrolito, mientras que para el mecanismo (5.10) tal explicación si es factible. Para corregir los valores de  $k_1$  y  $k_2$  se establece que los valores de  $\gamma$  para  $\text{H}^+$  y  $\text{TBA}^-$  pueden evaluarse por medio de la ecuación de Debye-Hückel en su forma extendida:

$$\log \gamma_{\pm} = -\frac{0.5Z^2\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \quad (5.11)$$

donde  $I$  es la fuerza iónica y  $Z$  la carga del ion.

Luego, la aplicación del tratamiento de Brønsted (Amis & Hinton, 1973) al mecanismo (5.10) da la siguiente ecuación:

$$k_1^a = k_1 \frac{\gamma^*}{\gamma_{\text{H}^+} \gamma_{\text{TBA}^-}}, \quad k_2^a = k_2 \frac{\gamma^*}{\gamma_{\text{H}^+} \gamma_{\text{TBA}^-}} \quad (5.12)$$



### 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

donde  $k_1^a$  y  $k_2^a$  son constantes "termodinámicas" que no dependen de la fuerza iónica,  $\gamma^*$  es el coeficiente de actividad del estado de transición (en este caso  $\gamma^*=1$  porque la carga del estado de transición es cero),  $\gamma_H$  y  $\gamma_{TBA}$  son los coeficientes de actividad de  $H_3O^+$  y TBA, calculados con la ecuación (5.11). En la tabla V.6 se presentan los valores de  $\gamma_H=\gamma_{TBA}$ ,  $k_1^a$  y  $k_2^a$ .

Tabla V.6. Constantes de velocidad "termodinámicas", calculadas con la ecuación (5.12) para el mecanismo (5.10).

$[HClO_4] (M)$	$\gamma_H=\gamma_{TBA}$	$k_1^a$	$k_2^a$
0.01	0.88	16	17
0.05	0.81	18	18
0.15	0.72	20	19
0.5	0.62	20	20
1.0	0.56	13	13

Tomando en cuenta que la ecuación (5.11) es muy aproximada, especialmente a fuerzas iónicas elevadas, como 0.5-1.0 M, podemos considerar los valores de  $k_1^a$  y  $k_2^a$  lo suficientemente constantes para aceptar el mecanismo (5.10) como correcto.

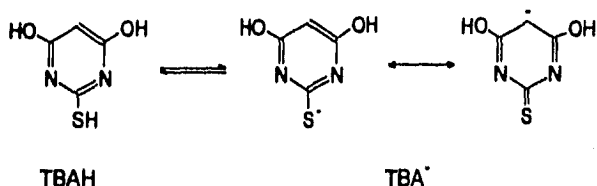


## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

### 5.5 Mecanismo de la Reacción TBA-MA

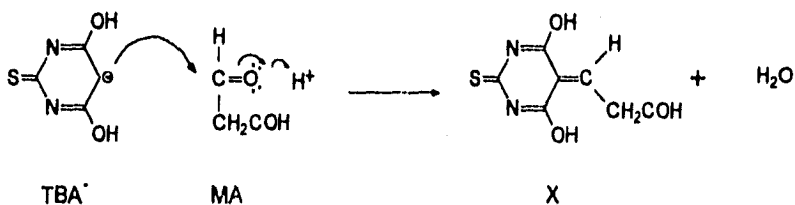
Los datos cinéticos obtenidos de este estudio nos permiten proponer el siguiente mecanismo para la reacción (1).

La primera etapa es la disociación del TBA que es rápida y reversible, formando la especie reactiva TBA<sup>-</sup>:



El hecho de que TBA<sup>-</sup> y no TBAH, sea la especie reactiva se explica mediante su existencia en la forma mesomérica con carga negativa transferida al carbono *para* de la molécula, el cual ataca al grupo carbonilo del MA.

Esta etapa incluye catálisis ácida que es típica de procesos de condensación con grupos carbonilo:



## 5. Cinética de la Reacción TBA-MA

En la siguiente etapa, el segundo anión  $TBA^-$  ataca al otro grupo carbonilo del MA a través del mismo mecanismo. Es importante mencionar que el mecanismo propuesto también explica en forma lógica la estructura del producto final TMT.

En resumen, de esta parte del trabajo tenemos que:

-La reacción TBA-MA se realiza en dos etapas, en la primera se forma un intermediario incoloro constituido por una molécula de TBA y una de MA; en la segunda

etapa otra molécula de TBA se añade al intermediario para dar lugar al producto de la reacción que absorbe a 532 nm.

-La energía de activación para la primera etapa es de  $13.0 \pm 1.5$  kcal/mol y para la segunda  $8.0 \pm 1.0$  kcal/mol.

-Dado que el aumento en la concentración de TBA no produjo cambios en la concentración final del producto TMT, puede decirse que la reacción es prácticamente irreversible.

Así, la siguiente fase de este trabajo consistió en buscar un catalizador más efectivo que el  $H_3O^+$  o que pudiera complementar su acción catalizadora.



## 6. Posibles Catalizadores

### 6. Posibles Catalizadores

En principio se probaron algunos tensoactivos pues existen referencias (Yatsimirski et al., 1994) de que estos muestran actividad catalizadora en reacciones de condensación del tipo de la reacción (1).

Los tensoactivos que se probaron fueron: dodecilsulfato de sodio (SDS), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTBA), y Triton-X-100. En el caso del CTBA fue necesario cambiar el ácido perclórico por clorhídrico pues el perclórico precipita al CTBA.

#### 6.1 Dodecilsulfato de Sodio (SDS)

El primer tensoactivo que se probó fue el SDS en concentraciones de 0.005 y 0.02 M, es decir, mayores que su concentración micelar crítica (cmc) que es igual a 0.002 M en medios ácidos (Bunton y Wolf, 1973). La concentración del resto de los reactivos fue:

$$[\text{MA}] = 10 \mu\text{M}$$

$$[\text{TBA}] = 0.005 \text{ M}$$

$$[\text{HClO}_4] = 0.25 \text{ M}$$

y la temperatura de trabajo 25°C. La absorbancia del producto TMT a 532 nm se registró durante 30 minutos.

Como se observa en la **figura 6.1**, la adición de SDS no tuvo efecto en la velocidad de la reacción TBA-MA. Las tres curvas se ajustaron con la ecuación (5.3) (ver Capítulo 5 y Apéndice A), ejemplo del ajuste en la **figura 6.2**, encontrándose que las constantes no muestran diferencias importantes entre sí.





## 6. Posibles Catalizadores

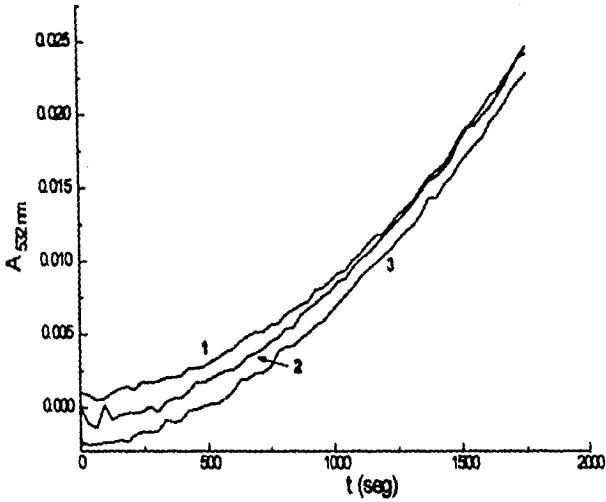


Figura 6.1. Avance de la reacción TBA-MA a 25°C. 1 sin SDS, 2 con SDS 0.005M, 3 con SDS 0.02 M.  $[MA]=10\mu M$ ,  $[TBA]=0.005 M$  y  $[HClO_4]=0.25 M$

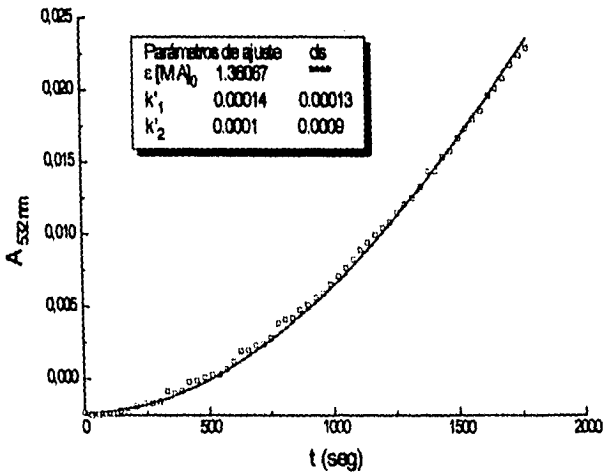


Figura 6.2. Ajuste de la curva 3 de la figura 6.1. El símbolo  $\square$  corresponde a los puntos experimentales y la línea al ajuste con (5.3).



## 6. Posibles Catalizadores

**Tabla VI.1.** Absorbancia infinita, y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA con diferentes concentraciones de SDS a 25°C.

[SDS] (M)	$c[MA]_0$	$k'_1 \pm ds^*$ $\times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )	$k'_2 \pm ds^*$ $\times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )
0	1.36067	1.0 ± 5.0	1.0 ± 5.0
0.005	1.36067	1.0 ± 8.0	1.0 ± 9.0
0.02	1.36067	1.0 ± 1.0	1.0 ± 0.9

\*Estos errores tan elevados en las constantes son el resultado del ajuste de únicamente la parte inicial de la curva, cuando existe una alta dependencia entre  $k'_1$  y  $k'_2$ .

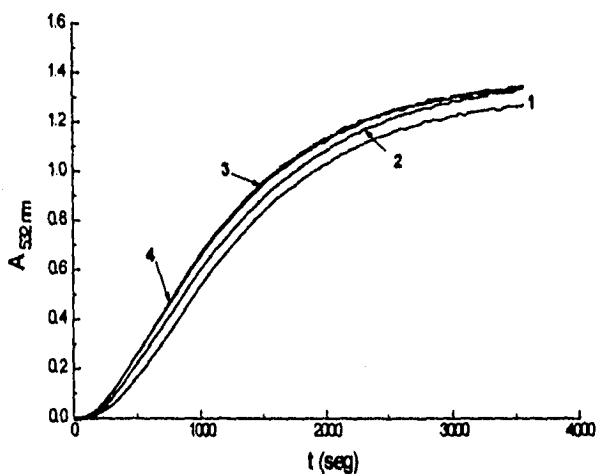
Como se observa en la **figura 6.1** y en la **tabla VI.1** el seguir la reacción a 25 °C no nos permite llegar a la conversión total de MA en TMT en un tiempo tolerable, como tampoco es posible hacer un buen ajuste con la ecuación (5.3).

También se hicieron algunas pruebas a 50°C, donde la concentración de MA fue 10 μM, y de TBA 0.03 M. En este caso no se añadió ácido perclórico.

Las curvas obtenidas se muestran en la **figura 6.3** y los resultados de su ajuste con la ecuación (5.3) (ejemplo **figura 6.4**) se resumen en la **tabla VI.2**, donde podemos ver que el SDS aumentó solo en un 50% el valor de  $k'_1$ , y en particular no afecta  $k'_2$ , es decir, el SDS tiene un efecto muy pequeño en la velocidad de la reacción TBA-MA, con lo cual se descarta la posibilidad de emplearlo como un catalizador suficientemente efectivo para esta reacción.



## 6. Posibles Catalizadores



**Figura 6.3.** Avance de la reacción TBA-MA a 50°C. 1 sin SDS, 2 con SDS 0.04M, 3 con SDS 0.02 M y 4 con SDS 0.01M.  $[MA]=10 \mu\text{M}$  y  $[TBA]=0.03 \text{ M}$ .

**Tabla VI.2.** Absorbancia infinita, y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA con diferentes concentraciones de SDS a 50°C.

[SDS] (M)	$\epsilon[MA]_0$	$k'_1 \pm ds$ $\times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k'_2 \pm ds$ $\times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
0	1.36067	$1.08 \pm 0.04$	$1.70 \pm 0.1$
0.01	1.36067	$1.60 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$
0.02	1.36067	$1.77 \pm 0.07$	$1.48 \pm 0.05$
0.04	1.36067	$1.50 \pm 0.4$	$1.5 \pm 0.4$



## 6. Posibles Catalizadores

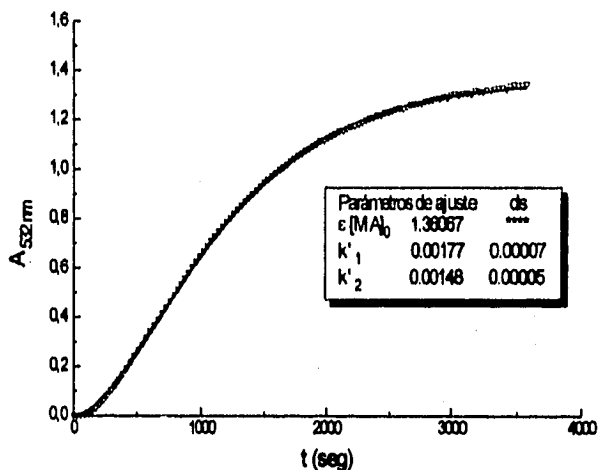


Figura 6.4. Ajuste de la curva 3 mostrada en la figura anterior. Los datos experimentales están representados con símbolos y el ajuste con la línea continua.

### 6.2 Triton-X-100

Con Triton X-100 cuya cmc es 0.0015 % (Sigma, 1995) se trabajó a una concentración del 1% sin obtener tampoco cambios en la velocidad de la reacción (1). Las concentraciones de MA, TBA y HClO<sub>4</sub> fueron las mismas que en los experimentos con SDS a 25°C. Los resultados, su ajuste y parámetros calculados se muestran en las figuras 6.5, 6.6 y tabla VI.3.



## 6. Posibles Catalizadores

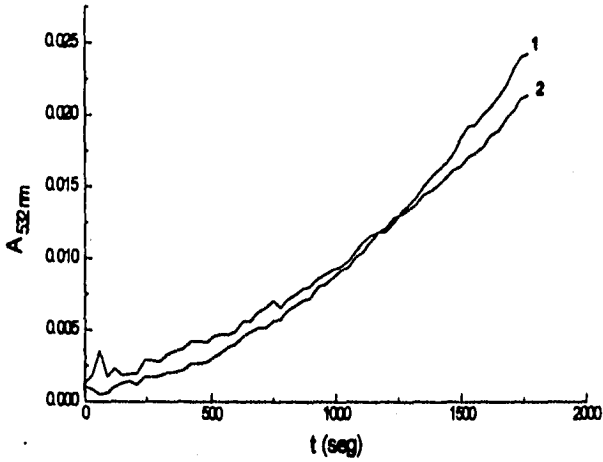


Figura 6.5. Efecto de la adición de Triton-X-100 sobre la velocidad de la reacción TBA-MA a 25°C. 1 sin Triton-X-100, 2 con Triton-X-100 al 1%. [MA]<sub>0</sub>=10 μM, [TBA]=0.005 M y [HClO<sub>4</sub>]=0.25 M

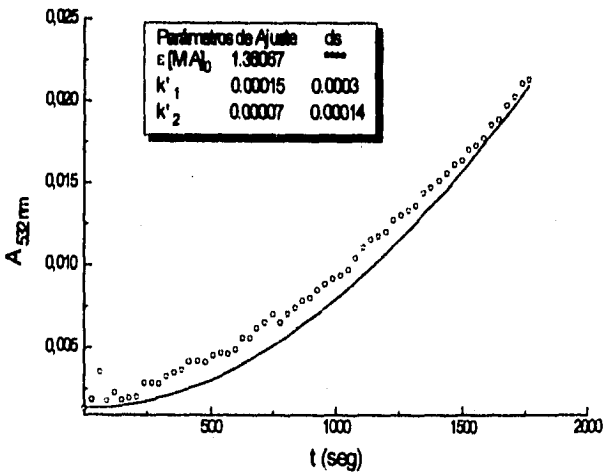


Figura 6.6. Ajuste de la curva número 2 de la figura 6.5.- lecturas de absorción a 532 nm y la línea corresponde al ajuste con (5.3)



## 6. Posibles Catalizadores

Tabla VI.3. Absorbancia infinita, y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA con y sin Triton-X-100 a 25°C.

Triton-X-100	$c[MA]_0$	$k'_1 \pm ds^*$ $\times 10^6 (s^{-1})$	$k'_2 \pm ds^*$ $\times 10^6 (s^{-1})$
0 %	1.36087	$1.0 \pm 5.0$	$1.0 \pm 5.0$
1 %	1.36087	$1.0 \pm 3.0$	$1.0 \pm 1.0$

\*Estos errores tan elevados en las constantes son el resultado del ajuste de únicamente la parte inicial de la curva, cuando existe una alta dependencia entre  $k'_1$  y  $k'_2$ .

A 50°C en las mismas condiciones que para el SDS se obtuvieron las curvas que se muestran en la figura 6.7 y el ajuste respectivo en la figura 6.6.

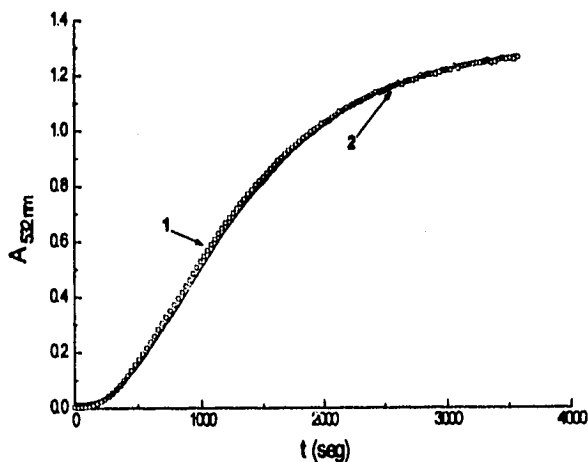


Figura 6.7. Avance de la reacción TBA-MA a 50°C. 1 sin Triton-X-100, 2 con Triton-X-100 al 1%.  $[MA]=10 \mu M$  y  $[TBA]=0.03 M$ .



## 6. Posibles Catalizadores

Tabla VI.4. Absorbancia infinita y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA con y sin Triton-X-100 a 50°C.

Triton-X-100	$\epsilon[MA]_0$	$k'_1 \pm ds$ $\times 10^3$	$k'_2 \pm ds$ $\times 10^3$
0 %	1.36067	$1.08 \pm 0.04$	$1.7 \pm 0.1$
1 %	1.36067	$1.3 \pm 0.9^*$	$1.0 \pm 1.0^*$

\*Estos errores tan elevados en las constantes son el resultado del ajuste de únicamente la parte inicial de la curva, cuando existe una alta dependencia entre  $k'_1$  y  $k'_2$ .

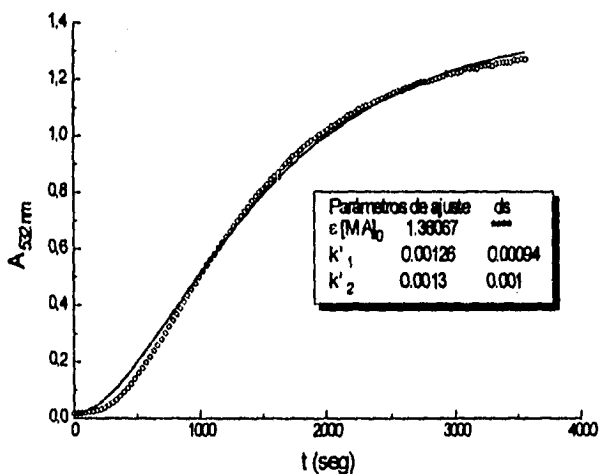


Figura 6.8. Ajuste de la curva 2 mostrada en la figura anterior. Los puntos experimentales corresponden a los símbolos y la línea continua al ajuste.



## 6. Posibles Catalizadores

Considerando los resultados de las tablas VI.3 y VI.4, podemos decir que el tensoactivo Triton-X-100 evidentemente no afecta la velocidad de la reacción TBA-MA tanto a 25 como a 50°C, es decir, no presenta efecto catalizador en la reacción (1).

### 6.3 Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTBA).

Con el tensoactivo bromuro de cetiltrimetilamonio con cmc de 0.026 mM se trabajó a una concentración de 0.05 M observando, contrario a lo que se esperaba, una disminución en la velocidad de la reacción TBA-MA. El resto de los reactivos fueron MA 10  $\mu$ M, TBA 0.03 M y HCl 0.05 M, la reacción se siguió por una hora a 50°C. Los resultados de la tabla VI.5 muestran que el efecto inhibitor del CTBA se debe a la disminución de  $k'_2$ .

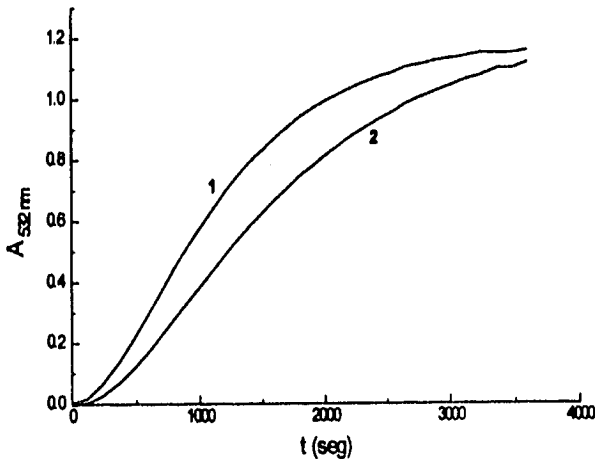


Figura 6.9. Cinéticas de la reacción TBA-MA a 50°C. 1 sin CTBA y 2 con CTBA 0.05 M. [MA]=10  $\mu$ M, [TBA]=0.03 M y [HCl]=0.05 M





## 6. Posibles Catalizadores

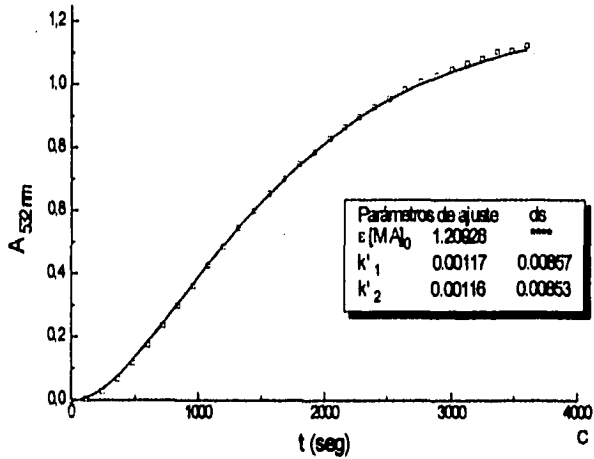


Figura 6.10. Ajuste de la curva 2 de la figura 6.9. El símbolo  $\square$  representa las lecturas de absorbancia a 532 nm y la línea corresponde al ajuste con (5.3).

Tabla VI.5. Absorbancia Infinita y constantes de velocidad para la reacción TBA-MA con y sin CTBA 0.05 M a 50°C.

CTBA (M)	$\epsilon[MA]_0$	$k'_1 \pm ds^*$ $\times 10^3$	$k'_2 \pm ds^*$ $\times 10^3$
0	1.20928	$1.2 \pm 0.03$	$2.2 \pm 0.08$
0.05	1.20928	$1.0 \pm 8.6$	$1.0 \pm 8.5$

\*En este caso los errores elevados en  $k'_1$  y  $k'_2$  se deben al hecho de que  $k'_1 \approx k'_2$  por lo que en la ecuación (5.3) aparece una indefinición tipo 0/0.

Así se tiene, que ninguno de los tensoactivos probados tuvo un efecto catalizador notable en la reacción TBA-MA (1), excepto en el caso del CTBA cuyo efecto fue negativo.



#### 4. Posibles Catalizadores

##### 5.4 Anilina

Fue reportado que la anilina cataliza la condensación de anilaldehídos con semicarbazonas (Jencks, 1975). Es lógico pensar que este tipo de catálisis puede realizarse en otras reacciones de condensación con grupos carbonilo y por ello, se probó este compuesto como posible medio de aumentar la velocidad de la reacción TBA-MA.

La anilina se añadió al medio de reacción en concentraciones de 0.001, 0.005 y 0.01 M. Desgraciadamente, este compuesto tampoco mostró actividad catalizadora en la reacción.

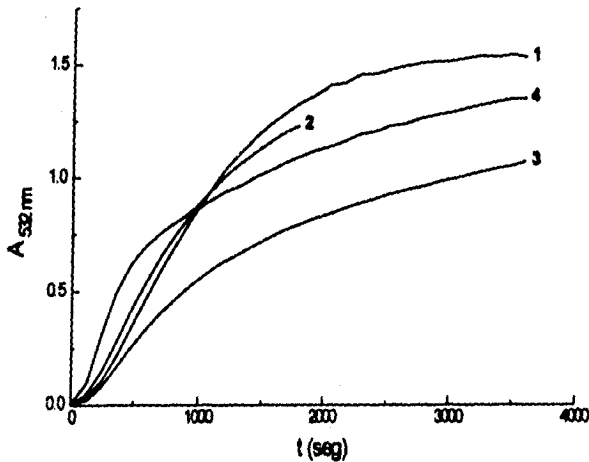


Figura 6.11. Absorbancia del producto TMT respecto al tiempo, la curva número 1 corresponde a la reacción sin anilina, 2 con anilina 0.001 M, 3 con anilina 0.005 M y 4 con anilina 0.01 M. [MA]=10  $\mu$ M, [TBA]=0.03 M, y [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M



## 6. Posibles Catalizadores

En la figura 6.11 se observa que con una concentración 0.01 M de anilina la reacción TBA-MA avanza con mayor rapidez que la reacción sin anilina, sin embargo, este aumento se tiene solo durante los 10 primeros minutos de la reacción después de los cuales la pendiente de la curva disminuye.

Este comportamiento puede atribuirse a la existencia de alguna reacción entre anilina y MA. Es posible que en un principio la reacción predominante sea la de anilina-MA, como se observa en la curva con anilina 0.01, y que el producto de esta interacción reaccione con TBA pero a una velocidad menor, que la reacción TBA-MA (1).

En el artículo publicado por Pegg *et al.*, (1992) se tiene que el MA puede reaccionar con el TBA y la sulfanilamida dando compuestos diferentes al TMT. Por un lado, el MA reacciona con una molécula de sulfanilamida y una molécula de TBA para dar un compuesto con un máximo de absorción a 532 nm. Tomando en cuenta que la anilina reaccionaría en forma similar a la sulfanilamida, el producto de la reacción entre MA, TBA y anilina debe tener también un máximo de absorción a 532 nm por lo que no se presentarían cambios en la absorbancia a esta longitud de onda, es decir, la forma de la curva cinética no debería verse afectada.

En el mismo trabajo se establece que el MA puede reaccionar también con dos moléculas de sulfanilamida para dar un compuesto con bandas de absorción a 256, 332 y 396 nm. Esto podría explicar la disminución de la velocidad de la reacción TBA-MA con 0.01 M de anilina que observamos en la figura 6.11 pues el producto de MA con anilina no tiene banda de absorción a 532 nm. La reacción MA-Anilina podría interferir con la reacción MA-TBA después de los diez minutos en los que esta mostró un aumento en su velocidad.

De esta misma forma puede explicarse el cambio en la forma de la curva cinética de la reacción TBA-MA con anilina 0.005 M.



## 6. Posibles Catalizadores

Dado que a 0.01 M de anilina en el medio se observa un aumento en la velocidad de la reacción TBA-MA podría decirse que este compuesto a esta concentración tiene cierto efecto catalizador que desgraciadamente no puede aprovecharse por la posible interferencia de otras reacciones entre MA y anilina.

En la curva cinética con 0.001 M de anilina no se observa diferencia respecto a la curva de la reacción sin anilina, esto puede deberse a que a esta concentración, la anilina no interfiera con la reacción TBA-MA (figura 6.11).

### 6.4 Iones $\text{Cu}^{2+}$

Por último, se probó con Iones  $\text{Cu}^{2+}$  que en reacciones donde se forman bases de Schiff pueden actuar como catalizadores del tipo ácido de Lewis.

La concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  que se empleó fue de 0.002 M, manteniendo el TBA a 0.03 M,  $\text{HClO}_4$  0.05 M y MA 10  $\mu\text{M}$ .

Este intento resultó también fallido pues se formó un precipitado rojo, presumiblemente constituido por el cobre y el producto TMT. Este precipitado fue insoluble en disolventes orgánicos como el cloroformo y éter. Debido a la formación de este precipitado durante la reacción, fue imposible registrar adecuadamente la absorbancia del producto TMT a 532 nm.



## 6. Posibles Catalizadores

En conclusión de este capítulo tenemos que:

-Los tensoactivos dodecilsulfato de sodio y Triton-X-100 no mostraron un efecto catalizador positivo importante en la reacción TBA-MA, mientras que el efecto del bromuro de cetiltrimetilamonio fue negativo específicamente sobre  $k'_2$ .

-La presencia de anilina en el medio de la reacción (1) tuvo cierto efecto inhibitor probablemente debido, a la formación del producto anilina-MA-anilina.

-La especie  $\text{Cu}^{2+}$  que se propuso como catalizador inorgánico formó un precipitado rojo con el producto TMT que fué insoluble tanto en soluciones ácidas como en disolventes orgánicos, por lo cual no es posible añadirlo al medio de reacción como catalizador.

De esta manera, y a pesar de probar con compuestos orgánicos e inorgánicos que pudieran aumentar la velocidad de la reacción TBA-MA, no se encontró el catalizador adecuado para dicha reacción.



## **7. Fluorescencia del Producto de La Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas**

### **7. Estudio de la Fluorescencia del Producto de la reacción TBA-MA (TMT) en Presencia de Ciclodextrinas**

Dado que no se encontró un catalizador para favorecer la reacción TBA-MA, se optó por buscar un medio para aumentar la sensibilidad del método mejorando o aumentando la fluorescencia del producto TMT. En este caso, se escogieron las ciclodextrinas que se emplean frecuentemente para fortalecer la fluorescencia de varios analitos (Frankewich *et al.*, 1981).

#### **7.1 Ciclodextrinas (CD)**

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por seis o más unidades de glucopiranosas unidas vía enlaces 1, 4-éter. Las ciclodextrinas más comunes son la  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - con seis, siete y ocho unidades de glucopiranosas respectivamente. La estructura de las ciclodextrinas corresponde a la de un cono truncado con una cavidad intermedia que aumenta de diámetro con el número de unidades de glucosa (Li y Purdy, 1992). La cavidad está formada por los átomos de hidrógeno y puentes glucosídicos. Los pares electrónicos no enlazados de los puentes glucosídicos están dirigidos hacia el interior de la cavidad, produciendo una alta densidad electrónica y dándole cierto carácter de base de Lewis. Como resultado de este particular arreglo de los grupos funcionales en las ciclodextrinas, la cavidad es relativamente hidrofóbica, mientras que la parte externa es hidrofílica. En las moléculas de ciclodextrina se forma también un anillo intramolecular de puentes de hidrógeno entre los grupos 2- y 3-hidroxilo de unidades adyacentes de glucosa. Este anillo de puentes de hidrógeno da a la ciclodextrina una marcada rigidez estructural (Frankewich



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

et al., 1991). En la tabla VII.1 se muestran algunas características de las ciclodextrinas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD).

Tabla VII.1. Características de la  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e HP- $\beta$ -ciclodextrinas.

Ciclodextrina	Unidades de glucosa	Diámetro de la cavidad (Å)	Solubilidad en agua (g/100ml)
$\alpha$ -	6	4.7-5.3	14.5
$\beta$ -	7	6.0-6.5	1.85
$\gamma$ -	8	7.5-8.3	23.2
HP- $\beta$ -	7	6.0-6.5	62.08

Algunas moléculas con dimensiones adecuadas pueden interactuar con las ciclodextrinas y fijarse en su cavidad formando complejos de inclusión, lo cual lleva a un aumento o fortalecimiento de la fluorescencia. La inclusión de un analito en ciclodextrinas ofrece ciertas ventajas como:

1. La conformación estructural de la ciclodextrina protege el estado singulete (fluorescencia) o triplete (fosforescencia) de los analitos de los desactivadores externos.
2. Como consecuencia de la formación del complejo de inclusión, la rotación de la molécula huésped se obstaculiza, y la relajación de las moléculas de disolventes disminuye considerablemente. Ambos efectos dan por resultado un decremento de la desactivación vibracional.
3. La cavidad de la ciclodextrina se comporta en forma similar a un disolvente orgánico. Esto genera un medio no polar para el cromóforo incluido. Este microambiente



## **7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas**

provee polaridad favorable y equilibrios ácido/base para aumentar la eficiencia cuántica y con ello, la intensidad de la fluorescencia.

4. La solución de ciclodextrina puede mejorar el límite de detección de analitos hidrofóbicos en solución acuosa por el incremento de su solubilidad o para los analitos

hidrofílicos aumentando la solubilidad de compuestos fluorescentes insolubles en agua en los que los analitos pueden estar incorporados.

Por todo esto, se pensó que la adición de ciclodextrinas podría ser el medio adecuado para aumentar la sensibilidad del método del TBA pues con el fortalecimiento de la fluorescencia del TMT sería posible detectarlo a muy bajas concentraciones.

### **7.2 Efecto de las Ciclodextrinas $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - e Hidroxipropil- $\beta$ -CD en la Fluorescencia del Producto TMT.**

En primer lugar, se determinaron los máximos de excitación y de emisión para el TMT, que fueron 520 y 552 nm respectivamente **figuras 7.1 y 7.2**. Los máximos de emisión reportados para el TMT varían de 547 a 553 nm (Toffaletti y Thompson, 1995), debido probablemente a las diferencias entre los medios de reacción. El máximo de excitación debe coincidir con el de absorción (532 nm), pero algunos autores usan longitudes de onda de excitación menores, entre 515 y 525 nm (Toffaletti y Thompson, 1995; Espinosa-Mansilla, 1996), para minimizar el efecto de dispersión de Rayleigh, el cual perturba fuertemente el espectro de emisión cuando la longitud de onda de excitación está cercana al máximo de emisión. En este estudio se encontró que a una longitud de onda de excitación de 520 nm la dispersión de Rayleigh no perturba la región del máximo de emisión y la intensidad de la





## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

fluorescencia es suficientemente alta para detectar  $0.1 \mu\text{M}$  de TMT, la cual es una sensibilidad típica de las determinaciones por fluorimetría.

Para estudiar el efecto de la  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e HP- $\beta$ -CD en la fluorescencia del TMT, se preparó este producto en una concentración de  $10 \mu\text{M}$ , esta solución se diluyó a  $0.1 \mu\text{M}$  y se registró su espectro de emisión, cabe mencionar que estas soluciones se prepararon con ácido perclórico  $0.05 \text{ M}$  pues se sabe que la reacción (1) es catalizada en medio ácido,

además, todas las variantes del método TBA emplean soluciones ácidas con pH de 1 a 3. A las soluciones  $0.1 \mu\text{M}$  de TMT se añadieron diferentes cantidades de ciclodextrina ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e HP- $\beta$ -CD), se agitó vigorosamente hasta lograr su disolución y después de cada adición se tomó el espectro de emisión.

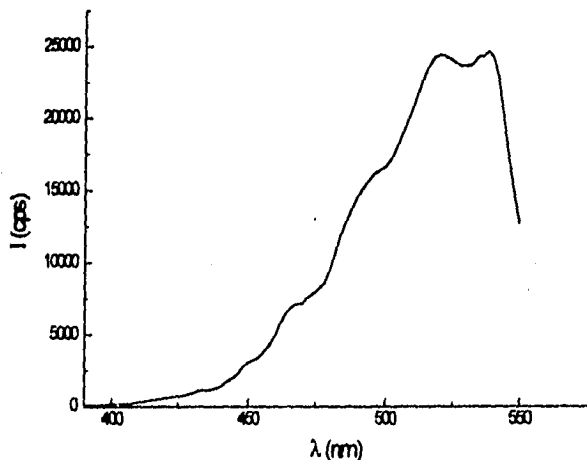


Figura 7.1. Espectro de excitación del producto TMT  $0.1 \mu\text{M}$  TMT,  $\lambda_{\text{em}}=554 \text{ nm}$ .



## 7. Fluorescencia del Producto de La Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

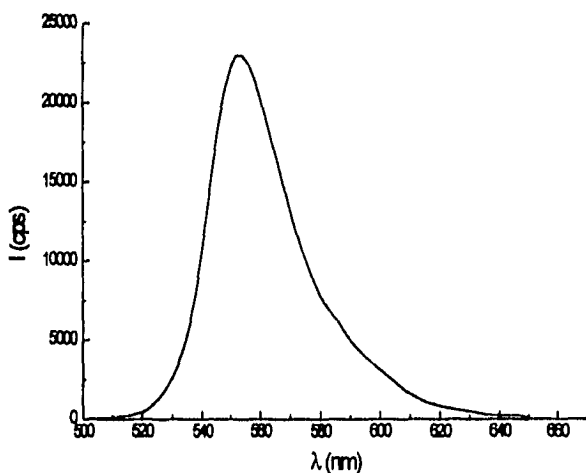


Figura 7.2. Espectro de emisión del producto TMT 0.1  $\mu$ M,  $\lambda_{ex}$ =520 nm.

### 7.2.1. $\alpha$ -Ciclodextrina

Los datos de intensidad del producto TMT en presencia de  $\alpha$ -CD se muestran en la tabla VII.2 y graficándolos contra la concentración de  $\alpha$ -CD se obtuvo la gráfica de la figura 7.3.

Tabla VII.2. Fluorescencia del producto TMT 0.1  $\mu$ M con  $\alpha$ -ciclodextrina.

[ $\alpha$ -ciclodextrina] (M)	$I_{520nm}$ (cps)
0	1171
0.00519	1206
0.01052	1158
0.03631	1343
0.06221	1488



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

En la gráfica se observa que la  $\alpha$ -CD muestra cierto efecto fortalecedor en la fluorescencia del producto TMT, sin embargo, este es muy modesto, cerca del 50% con la mayor concentración de CD. Además, no se observa ninguna tendencia a la saturación, y por el contrario hay una desviación de la linealidad lo cual implica la inclusión de un término cuadrático en la concentración de  $\alpha$ -CD.

Los puntos fueron ajustados con la ecuación (7.1) (ver Apéndice B):

$$I_{obs} = I_0 + I_{TMT-CD} K_1 [CD] + I_{TMT-CD_2} K_1 K_2 [CD]^2 \quad (7.1)$$

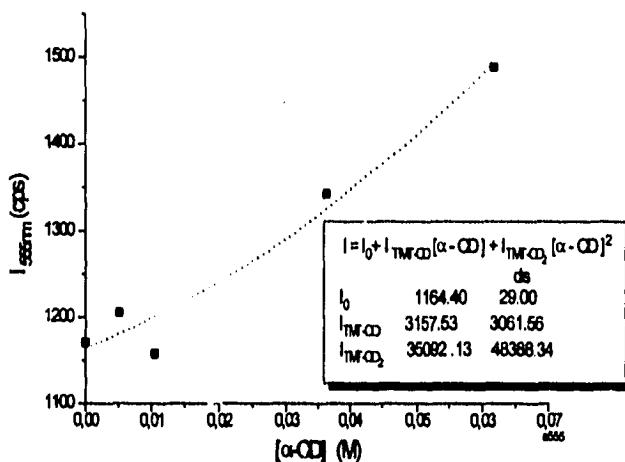
el resultado del mejor ajuste es el siguiente:

$$I(cps) = 1160 + 3160[\alpha - CD] + 35100[\alpha - CD]^2$$

Estas observaciones indican que la constante de unión TMT-CD es muy pequeña y probablemente el complejo de inclusión tiene una estequiometría 2:1  $\alpha$ -CD:TMT.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas



**Figura 7.3.** Fluorescencia del producto TMT 0.1  $\mu\text{M}$  respecto a la concentración de  $\alpha$ -ciclodextrina. Los puntos corresponden a la intensidad de la fluorescencia del producto TMT a diferentes concentraciones de  $\alpha$ -CD y la línea punteada, al ajuste con la ecuación (7.1).

Con la adición de ciclodextrinas, se registró un desplazamiento del máximo de emisión y por ello en las **tablas VII.2, VII.3, VII.4 y VII.5** los resultados de intensidad de fluorescencia se reportan a la longitud de onda en la cual se registró el máximo de emisión con la mayor concentración de cada CD.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

### 7.2.2. $\beta$ -, $\gamma$ - e Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrinas

Para la  $\beta$ -,  $\gamma$ - e Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) se observó un efecto fortalecedor de la fluorescencia mayor que en el caso de la  $\alpha$ -CD. La intensidad de la fluorescencia del producto TMT con cada ciclodextrina se presenta en las **tablas VII.3, VII.4 y VII.5**. Las gráficas generadas de estas tablas se muestran en las **figuras 7.4, 7.5 y 7.6** en las cuales se observa una tendencia hiperbólica que es característica de complejos de inclusión 1:1; los puntos experimentales se ajustaron con la ecuación:

$$I(\text{cps}) = \frac{I_0 + I_c K[\text{CD}]}{1 + K[\text{CD}]} \quad (7.2)$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la fluorescencia del TMT libre,  $I_c$  es la intensidad del TMT unido a la CD y  $K$  es la constante de unión. El resultado de los ajustes se reporta en la **tabla VII.6**.

**Tabla VII.3.** Fluorescencia del producto TMT 0.1 $\mu$ M con  $\beta$ -ciclodextrina.

$[\beta\text{-CD}]$ (M)	$I_{644 \text{ nm}}$ (cps)
0	1078
0.0009	1363
0.00178	1436
0.00361	1530
0.00539	1613
0.0072	1705
0.00899	1671



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

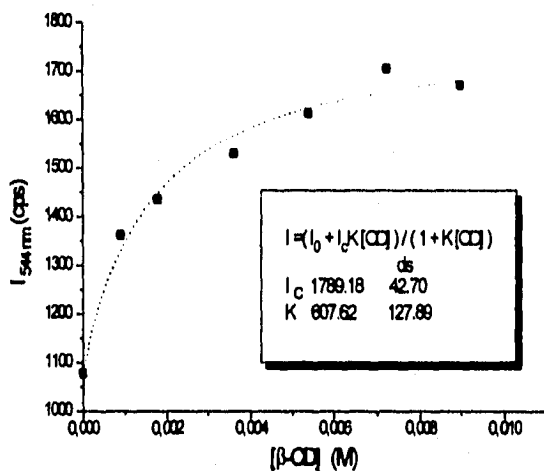


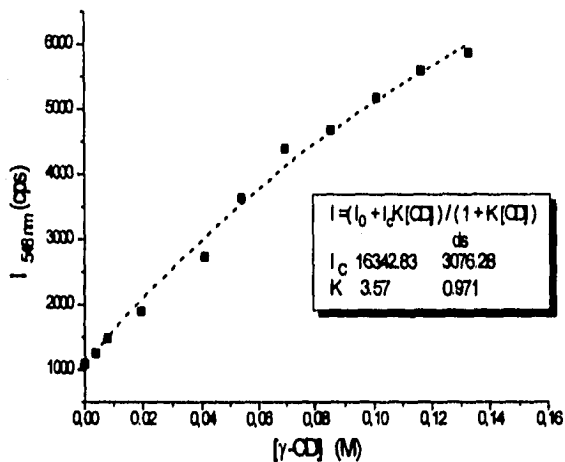
Figura 7.4. Fortalecimiento de la fluorescencia del producto TMT 0.1  $\mu$ M con  $\beta$ -CD. Los puntos corresponden a la intensidad de la fluorescencia del producto TMT a diferentes concentraciones de  $\beta$ -CD y la línea punteada, al ajuste con la ecuación (7.2).

Tabla VII.4. Fluorescencia del producto TMT 0.1  $\mu$ M con  $\gamma$ -ciclodextrina.

[ $\gamma$ -ciclodextrina]M	$I_{540 \text{ nm}}$ (cps)
0	1085
0.00392	1258
0.00790	1485
0.01951	1898
0.04098	2735
0.05422	3640
0.06964	4395
0.08530	4676
0.10097	5176
0.11658	5586
0.13320	5861



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas



**Figura 7.5.** Fortalecimiento de la fluorescencia del producto TMT 0.1  $\mu$ M con  $\gamma$ -CD. Los puntos corresponden a la intensidad de la fluorescencia del producto TMT a diferentes concentraciones de  $\gamma$ -CD y la línea punteada, al ajuste con la ecuación (7.2)

**Tabla VII.5.** Fluorescencia del producto TMT 0.1  $\mu$ M con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

[HP- $\beta$ -CD] M	$I_{548nm}$ (cps)
0	1276
0.012	4053
0.01690	4475
0.02174	4585
0.02667	4695
0.03164	4868
0.03660	4908



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

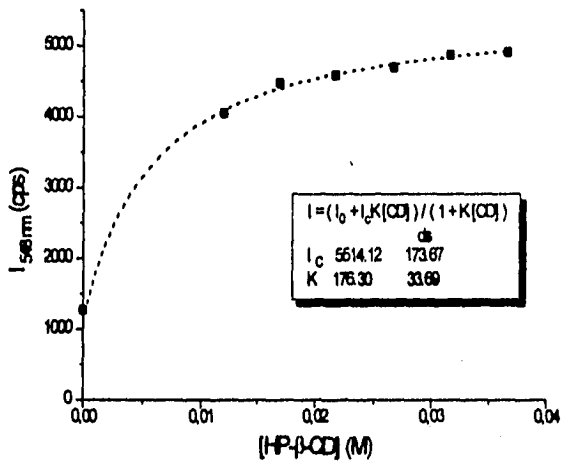


Figura 7.4. Fortalecimiento de la fluorescencia del en producto TMT 0.1  $\mu$ M con HP- $\beta$ -CD. Los puntos corresponden a la intensidad de la fluorescencia del producto TMT a diferentes concentraciones de HP- $\beta$ -CD y la línea punteada, al ajuste con la ecuación (7.2).

Tabla VII.6. Constantes de inclusión y factor de fortalecimiento de fluorescencia del producto TMT con diferentes ciclodextrinas

Ciclodextrina	$I_0$ (cps)	$I_c$ (cps) $\pm$ ds	$K$ ( $M^{-1}$ ) $\pm$ ds	$I_c / I_0$
$\beta$ -ciclodextrina	1080	1800 $\pm$ 40	600 $\pm$ 100	1.66
$\gamma$ -ciclodextrina	1080	16300 $\pm$ 3100	3.6 $\pm$ 1.0	15.09
Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	1080	5500 $\pm$ 200	160 $\pm$ 30	5.09





## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

La adición de estas ciclodextrinas produjo además del fortalecimiento de la fluorescencia, el desplazamiento del máximo de emisión del TMT de 553 nm en agua a 544 en presencia de  $\beta$ -CD y 548 nm con  $\gamma$ - e HP- $\beta$ -CD. Tal desplazamiento hacia el azul inducido por las ciclodextrinas se observa típicamente en diferentes analitos (Frankewich *et al.*, 1991). También es común que el TMT se una más débilmente a la HP- $\beta$ -CD que a la  $\beta$ -CD no sustituida (Frankewich *et al.*, 1991). Respecto a la tendencia general en las constantes de unión, **tabla VII.6**,  $\alpha$ -CD <  $\gamma$ -CD < HP- $\beta$ -CD <  $\beta$ -CD; debe decirse que para que exista una unión firme y estrecha entre el analito y la CD es indispensable una inclusión complementaria entre ellos, de tal manera que la cavidad de la  $\gamma$ -CD es muy grande para ajustarse al TMT, mientras que la cavidad de la  $\alpha$ -CD es muy pequeña para permitir la inclusión de este compuesto en ella de forma adecuada lo cual se refleja en las constantes de unión. Al mismo tiempo, el factor de fortalecimiento de fluorescencia, evaluado como el cociente  $I_c/I_0$ , aumenta en el orden  $\beta$ -CD < HP- $\beta$ -CD <  $\gamma$ -CD, indica que es el volumen de la cavidad y no la fuerza del enlace el factor dominante. Esto está de acuerdo con el mecanismo del fortalecimiento de la fluorescencia de analitos incluidos en CDs, mencionado anteriormente, en el cual dicho fortalecimiento es atribuido a la protección del analito de la desactivación por moléculas de agua

El mayor valor de  $I_c/I_0$  se obtuvo con la  $\gamma$ -CD, pero su uso es impráctico, pues la pequeña constante de unión con el TMT lleva a la necesidad de añadir concentraciones muy altas de esta CD que es sumamente cara. La mayor constante de unión se observó con la  $\beta$ -CD, pero el factor de fortalecimiento es menor a 2. Así, entre las CDs que se probaron, el óptimo entre la capacidad de unión y el factor de fortalecimiento estuvo dado por la HP- $\beta$ -CD que por otro lado, es también la más soluble de las CDs que se probaron. De esta manera, se decidió continuar el estudio con la HP- $\beta$ -CD; en primer lugar, se construyó la curva de calibración de intensidad de la fluorescencia contra la concentración de TMT en presencia de HP- $\beta$ -CD 0.07 M, **tabla VII.7** y **figura 7.5**.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

Tabla VII.7. Fluorescencia del producto TMT con HP- $\beta$ -CD 0.07 M

[MA] (nM)	$I_{640 \text{ nm}}$ (cps)	[MA] (nM)	$I_{640 \text{ nm}}$ (cps)
0	129.816	7	393.940
2.5	194.727	10	495.447
5	288.000	12	553.905

La ecuación de la recta es:

$$I(\text{cps}) = (120 \pm 10) + (37 \pm 2)[\text{TMT}] \quad (7.3)$$

donde [TMT] está en nM. El límite de detección, calculado con  $3x(\text{DS de la ordenada al origen})/(\text{pendiente})$ , es igual a 0.8 nM y el rango de aplicación está entre 1.5 y 50 nM.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

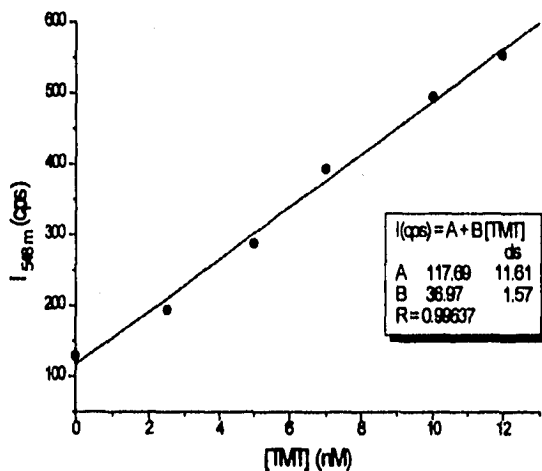


Figura 7.5. Curva patrón de TMT con HP- $\beta$ -CD 0.07 M.

Esta alta sensibilidad permite detectar el MA a un nivel de nM, pero puede ser también útil para el desarrollo de un método con sensibilidad "normal", por ejemplo en el rango 0.1-10  $\mu\text{M}$  el cual podría no necesitar un calentamiento prolongado para la conversión de MA en TMT. La reacción (1) es lenta y el calentamiento, usualmente a 60-94  $^{\circ}\text{C}$ , es necesario para realizar la reacción en un tiempo razonable, usualmente 10-60 min. El método fluorimétrico modificado con HP- $\beta$ -CD permite, sin embargo, detectar 0.1  $\mu\text{M}$  de MA cuando solo el 1% del aldehído se ha convertido en TMT. Podría esperarse que esta baja conversión se alcance durante una hora o menos aún a temperatura ambiente lo cual guió este estudio a investigar tal posibilidad.



**7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas**

**7.3 Determinación de MA por el Método Cinético-Fluorimétrico Mejorado con HP- $\beta$ -CD.**

En estudios preliminares se investigó la estabilidad de soluciones de TBA en presencia de HP- $\beta$ -CD en medio ácido. Inesperadamente, se observó la lenta formación de un producto amarillo desconocido. Por fortuna, este color no interfirió con la fluorescencia del TMT en las condiciones empleadas. En esta parte se estudió también el efecto de la concentración de TBA en el cociente señal/blanco ya que de esta relación depende la sensibilidad del método. Para ello se registraron cinéticas de la reacción (1) a diferentes concentraciones de TBA, manteniendo constantes MA, ácido perclórico y HP- $\beta$ -CD; de estas cinéticas se obtuvo la relación señal/blanco (s/b) a los 15 min, **tabla VII.8**, observando que la mayor de estas se da a 0.015 M de TBA, por esta razón se continuó el trabajo con esta concentración de TBA.

**Tabla VII.8.** Relación señal/blanco a los 15 min para la cinética de la reacción TBA-MA a diferentes concentraciones de TBA. [MA]=10  $\mu$ M, [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M y [HP- $\beta$ -CD]=0.07 M.

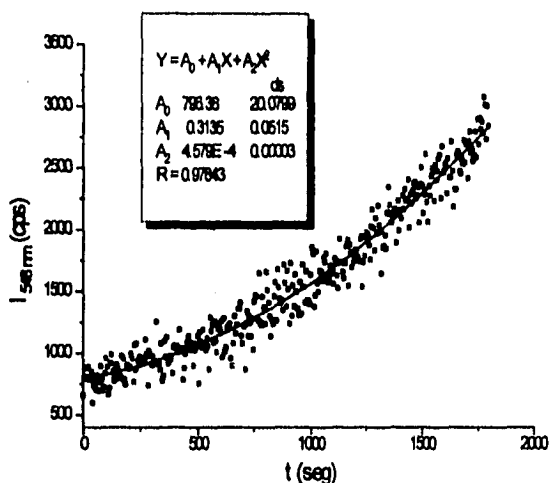
[TBA] (M)	blanco 548 nm (cps)	señal 548 nm(cps)	s/b
0.02	2980	19750	6.61
0.015	1190	8300	7.21
0.01	900	6080	6.75
0.005	560	3500	6.25



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

El siguiente paso fue obtener una curva de calibración de MA, siguiendo la cinética de la reacción TBA-MA en presencia de HP- $\beta$ -CD 0.07 M a temperatura ambiente para ello,

se prepararon soluciones de distinta concentración de MA en ácido perclórico 0.05 M. La ciclodextrina se disolvió directamente en la celda con la solución 0.015 de TBA y después de añadir el MA en solución se registró la intensidad de la fluorescencia a 548 nm durante media hora.



**Figura 7.6.** Fluorescencia del producto TMT a 548 nm respecto al tiempo a 25 °C. [MA]=0.8  $\mu$ M, [TBA]=0.015 M, [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M, [HP- $\beta$ -CD]=0.07 M. En el recuadro se muestran los resultados del ajuste de regresión polinomial.

En la **figura 7.6** se muestra la curva cinética obtenida con 0.8  $\mu$ M de MA. Los puntos corresponden a los registros de la intensidad de fluorescencia del producto TMT y la línea punteada al ajuste con el modelo de regresión polinomial.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

$$I(\text{cps}) = A_0 + A_1X + A_2X^2 \quad (7.4)$$

con el que se ajustaron todas las curvas y donde  $X$  es el tiempo en segundos.

Las curvas experimentales obtenidas a temperatura ambiente corresponden a la parte inicial de la interacción TBA-MA. Según nuestros datos (ver sección 5), la curva cinética total se ajusta con la ecuación (5.3) que durante la parte inicial de la reacción puede simplificarse utilizando la aproximación:

$$e^{-kt} = 1 - kt + \frac{k^2}{2}t^2$$

es decir, una serie de Taylor hasta el término cuadrático. Con esta aproximación y tomando en cuenta que la intensidad de la fluorescencia observada ( $I$ ) es proporcional a la concentración de TMT con un coeficiente de proporcionalidad  $i$  (sección 4.2), podemos escribir:

$$I = i[\text{TMT}] = i[\text{TMT}]_0 \left( 1 - \frac{k'_1 e^{-k'_1 t} - k'_2 e^{-k'_2 t}}{k'_1 - k'_2} \right) \approx i[\text{TMT}]_0 \left( \frac{k'_1 k'_2}{2} \right) t^2 \quad (7.5)$$

De la ecuación (7.5) se puede concluir que las curvas cinéticas en estas condiciones deben ser cuadráticas respecto al tiempo. Sin embargo, encontramos que la adición de un término lineal mejora considerablemente el ajuste. La explicación más lógica a esto es que el término lineal toma en cuenta la inevitable fluctuación del blanco, que se genera debido al largo periodo de medición, 30 minutos. Entonces, el sentido de los parámetros de la ecuación (7.4) es el siguiente:  $A_0$  es la intensidad del blanco,  $A_1$  refleja la velocidad de fluctuación del blanco (que es de hecho, muy pequeña) y finalmente,  $A_2$  es  $i[\text{TMT}]_0 k'_1 k'_2/2$ .



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

Evidentemente el parámetro proporcional a la concentración de TMT es  $A_2$  y puede utilizarse para construir su curva patrón, figura 7.7. Sin embargo, estadísticamente parece mejor utilizar los cambios de intensidad de fluorescencia a un tiempo fijo,  $\Delta I_t$ , los tiempos que se escogieron son 15 y 30 minutos, pues son los que generalmente se emplean para incubar la reacción en los procedimientos tradicionales reportados en la literatura.

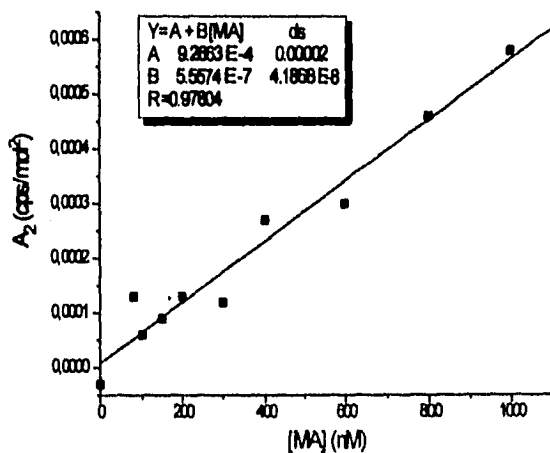


Figura 7.7. Curva patrón de MA a partir de  $i[TMT]_0 k_1 k_2/2 (A_2)$ .



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

Con las constantes obtenidas para cada curva, **tabla VII.9** se calculó la intensidad a 15 y 30 minutos a estas intensidades se restó el valor de la intensidad al tiempo cero de cada curva ( $A_0$ ).

$$\Delta I_{15} = I_{15} - A_0$$

$$\Delta I_{30} = I_{30} - A_0$$

y con estos  $\Delta I_{548 \text{ nm}}$ , **tablas VII.10 y VII.11; figuras 7.7 y 7.8** se construyó la curva patrón de MA para ambos tiempos.

**Tabla VII.9.** Coeficientes de la ecuación (7.4) para la curva patrón de MA.

[MA] (nM)	$A_0$	$A_1$	$A_2$
0	487	0.2	-3.05e-5
80	706	0.15	1.29e-4
100	948	0.2	5.93e-5
150	869	0.2	9.09e-5
200	990	0.2	1.33e-4
300	930	0.27	1.19e-4
400	1043	0.12	2.66e-4
600	763	0.36	2.97e-4
800	796	0.31	4.57e-4
1000	1123	0.42	5.8e-4





## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

Tabla VII.10. Curva patrón de MA con  $\Delta I_{548 \text{ nm}}$  a los 15 min de reacción.

[MA] (nM)	$\Delta I_{548 \text{ nm}, 30 \text{ min}}$ (cps)
0	155.29
80	239.49
100	227.03
150	253.62
200	288.73
300	339.39
400	323.46
600	564.57
800	649.17
1000	847.8

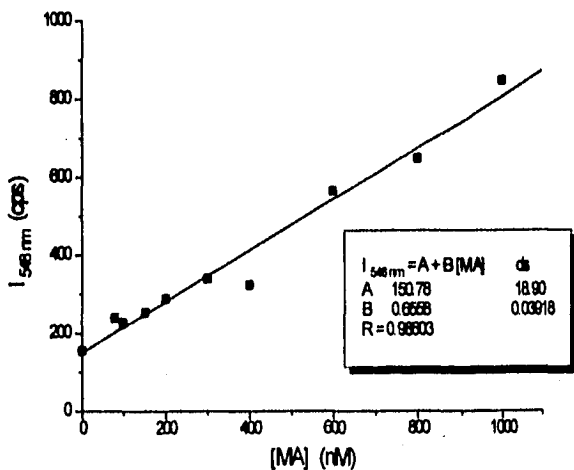


Figura 7.8. Curva Patrón de MA a los 15 min de reacción a 25°C. [TBA]=0.015 M, [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M, [HP-β-CD]=0.07 M. En el recuadro se muestran los resultados de regresión lineal.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

Ecuación de la recta a los 15 min:

$$\Delta I_{548nm} = (150 \pm 20) + (0.65 \pm 0.040)[MA] \quad (7.6)$$

con [MA] en nM.

Tabla VII.11. Curva patrón de MA con  $\Delta I_{548nm}$  a los 30 min de reacción.

[MA] (nM)	$\Delta I_{548nm}$ , 30min (cps)	[MA] (nM)	$\Delta I_{548nm}$ , 30min (cps)
0	261.18	300	871.56
80	687.96	400	1077.84
100	551.13	600	1610.28
150	654.51	800	2038.68
200	791.92	1000	2635.2

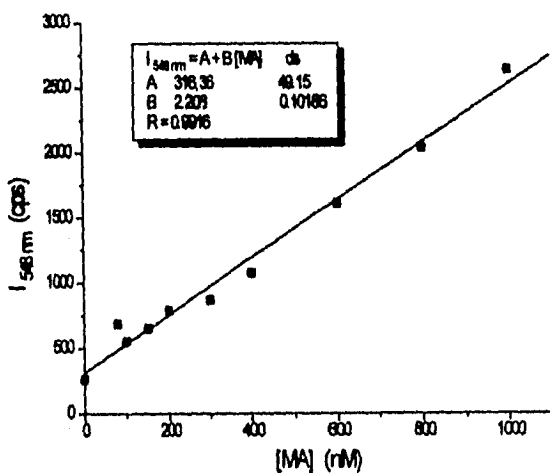


Figura 7.9. Curva Patrón de MA a los 30 min de reacción a 25°C. [TBA]=0.015 M, [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M, [HP-β-CD]=0.07 M. En el recuadro se muestran los resultados de regresión lineal.



## 7. Fluorescencia del Producto de la Reacción TBA-MA en Presencia de Ciclodextrinas

Ecuación de la recta a los 30 min:

$$\Delta I_{548nm} = (320 \pm 50) + (2.2 \pm 0.1)[MA] \quad (7.7)$$

donde [MA] es nM.

Es importante mencionar que la no linealidad de las curvas cinéticas excluye la posibilidad de utilizar sus pendientes iniciales para construir la curva patrón que es el método más común y sencillo en las determinaciones cinéticas (ver página 81, ecuación (7.5)).



## 8. Método Propuesto

### 8 Método Cinético-Fluorimétrico Propuesto para la Determinación de Malonaldehído

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten proponer la introducción de ciclodextrinas, en este caso de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, en el método del ácido tiobarbitúrico, como medio de aumentar su sensibilidad en la determinación del producto TMT por fluorimetría.

En este caso el método al que se llegó es un método cinético-fluorimétrico, en el cual se hace reaccionar una alícuota del extracto de la muestra con un volumen igual de TBA 0.015 M en el cual se disuelve la cantidad requerida de HP- $\beta$ -CD para dar una concentración en la celda 0.07 M. Se sigue la cinética de esta reacción a 25°C durante 40 min registrando la intensidad de la fluorescencia de la mezcla de reacción a 548 nm como  $\lambda_{em}$  y 520 nm como  $\lambda_{ex}$ . La curva obtenida se ajusta con la ecuación (7.4) y con las constantes del ajuste se calcula la intensidad a 15 y 30 min, con estos valores y la intensidad en el tiempo cero de la curva cinética se calcula  $\Delta I_{548\text{ nm}}$  y con la ecuación de la curva patrón para cada tiempo, (7.6) y (7.7), se calcula la concentración de MA en la celda.

#### 8.1 Aplicación del Método Propuesto en Muestras de Carne

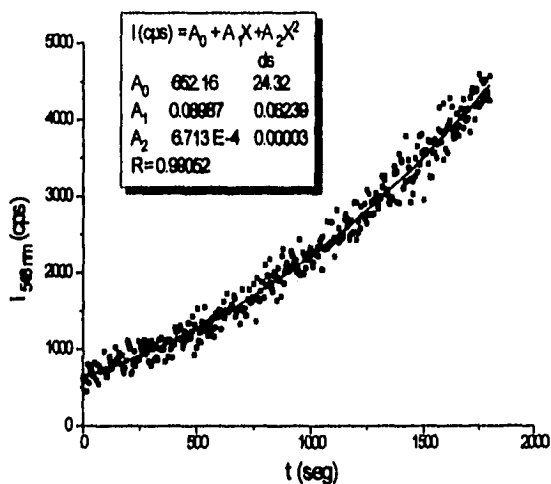
Así, la parte final del trabajo consistió en probar este método en sistemas reales y determinar el % de recuperación de MA. Las muestras con que se trabajó fueron carne de res y chuleta ahumada de puerco. De cada una de ellas se tomaron tres muestras de 10 g, a dos de ellas se añadieron 0.1 mL de MA 1500  $\mu$ M y se trataron como se explica en la metodología para obtener 3  $\mu$ M de MA añadido en el extracto. 1mL de extracto se puso a reaccionar con 1mL de TBA 0.03 M e HP- $\beta$ -CD 0.07 M (0.2157 g), de tal manera que en la



### 8. Método Propuesto

celda se tuvieron las siguientes concentraciones:  $[MA]_{añadido}=1.50 \mu\text{M}$ ,  $[TBA]=0.015 \text{ M}$ ,  $[\text{HClO}_4]=0.05 \text{ M}$  y  $[\text{HP-}\beta\text{-CD}]=0.07 \text{ M}$ .

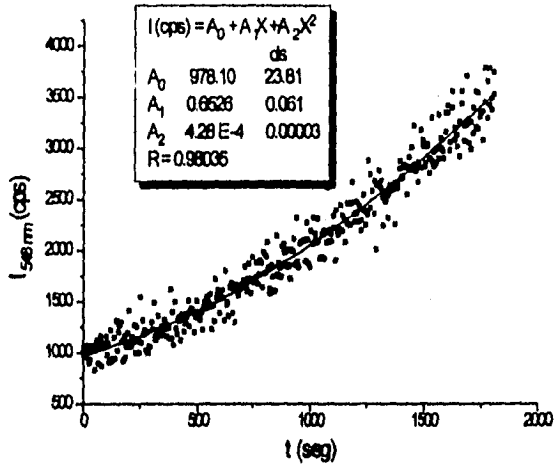
Se corrieron tres cinéticas de cada extracto, las curvas se trataron como se explicó antes y los resultados de  $\Delta I_{548 \text{ nm}}$  para cada muestra a 15 y 30 minutos se resumen en las **tablas VIII.3 y VIII.4**. En las **figuras 8.1 y 8.2** se presenta un ejemplo de las curvas registradas para carne de res y chuleta ahumada de puerco así como su ajuste con la ecuación (7.4).



**Figura 8.1.** Curva cinética obtenida con extracto de carne de res y MA  $1.5 \mu\text{M}$  a  $25^\circ\text{C}$  (B1).  $[TBA]=0.015 \text{ M}$ ,  $[\text{HClO}_4]=0.05 \text{ M}$  y  $[\text{HP-}\beta\text{-CD}]=0.07 \text{ M}$ .



## 8. Método Propuesto



**Figura 8.2.** Curva cinética obtenida con extracto de chuleta ahumada de puerco y MA 1.5  $\mu\text{M}$  a 25°C (F3).  $[\text{TBA}] = 0.015 \text{ M}$ ,  $[\text{HClO}_4] = 0.05 \text{ M}$  y  $[\text{HP-}\beta\text{-CD}] = 0.07 \text{ M}$ .

En las tablas VIII.1 y VIII.2 se presentan los parámetros  $A_0$ ,  $A_1$  y  $A_2$  de los ajustes de las curvas cinéticas de las muestras.

Las muestras se nombraron de la siguiente manera: A y D son respectivamente, los extractos de carne de res y chuleta ahumada de puerco sin MA añadido, mientras que los extractos con MA 1.5  $\mu\text{M}$  son B y C para carne de res y E y F para chuleta ahumada. Los números 1-3 corresponden a las repeticiones de la determinación.



## 8. Método Propuesto

**Tabla VIII.1.** Coeficientes de la ecuación (7.4) para las muestras de carne de res. B y C son las muestras con MA añadido.

Muestra	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
A1	650	0.21	6e-5
A2	642	0.4	-1e-5
A3	690	0.24	6.6e-5
B1	650	0.9	6.7e-4
B2	450	0.92	6.9e-4
B3	640	1.68	2.1e-4
C1	610	1.4	3.1e-4
C2	730	1.4	4e-4
C3	610	1.48	3.1e-4

**Tabla VIII.2.** Constantes de la ecuación (7.4) para las muestras de chuleta ahumada de puerco. E y F son las muestras con MA añadido.

Muestra	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
D1	640	0.1	4e-5
D2	640	0.1	2e-5
D3	630	0.1	4e-5
E1	720	0.6	4.9e-5
E2	780	0.58	4.8e-5
E3	780	0.59	5e-5
F1	1080	0.93	2.3e-5
F2	1024	0.72	3.7e-5
F3	980	0.65	4.3e-4



## 8. Método Propuesto

**Tabla VIII.3.**  $\Delta I_{548 \text{ nm}}$  a 15 y 30 min de las curvas cinéticas de los extractos de carne de res. A es la muestra sin MA añadido, B y C son la muestras con MA 1.5  $\mu\text{M}$  en la celda.

Determinación	$\Delta I_{548 \text{ nm}}, 15 \text{ min}$	$\Delta I_{548 \text{ nm}}, 30 \text{ min}$
A1	237.6	572.4
A2	351.9	687.6
A3	269.46	643.5
B1	1352.7	3790.8
B2	1386.9	3891.6
B3	1682.1	3704.6
C1	1511.1	3524.4
C2	1584.0	3816.0
C3	1583.1	3668.4

**Tabla VIII.4.**  $\Delta I_{548 \text{ nm}}$  a 15 y 30 min de las curvas cinéticas de los extractos de chuleta ahumada de puerco. D es la muestra sin MA añadido, E y F son la muestras con MA 1.5  $\mu\text{M}$  en la celda.

Determinación	$\Delta I_{548 \text{ nm}}, 15 \text{ min}$	$\Delta I_{548 \text{ nm}}, 30 \text{ min}$
D1	122.4	309.6
D2	106.2	244.8
D3	122.4	309.6
E1	936.9	2667.6
E2	910.8	2599.2
E3	936.0	2682.0
F1	1023.3	2419.2
F2	947.7	2494.8
F3	933.3	2563.0





### 8. Método Propuesto

Para cada muestra se calculó el valor promedio de  $\Delta I_{548 \text{ nm}}$  y con la ecuación de la curva patrón a 15 y 30 minutos se obtuvo la concentración de MA en cada muestra. Los resultados de estos cálculos se presentan en las tablas VIII.5-VIII.8 donde se muestra también los % de recuperación y la cantidad de MA expresada como Número TBA (No. TBA) que son mg de MA en un kg de carne.

**Tabla VIII.5.** Concentración de MA No. de TBA y % de recuperación para las muestras de carne de res determinados con el método cinético-fluorimétrico propuesto a los 15 minutos.

Muestra	Peso (g)	$\Delta I_{548 \text{ nm, 15 min}}$ $\pm ds$	[MA] <sub>15 min</sub> $\pm ds^*$ ( $\mu\text{M}$ )	No. TBA <sub>15 min</sub> $\pm ds$ mgMA/kg	% Rec.
A	10.2330	290 $\pm$ 50	0.21 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.03	
B	10.2892	1500 $\pm$ 100	2.1 $\pm$ 0.1	1.47 $\pm$ 0.07	126
C	10.6290	1500 $\pm$ 30	2.08 $\pm$ 0.06	1.40 $\pm$ 0.04	124.6

\*Esta es la concentración de MA de la dilución en la celda.

**Tabla VIII.6.** Concentración de MA No. de TBA y % de recuperación para las muestras de carne de res determinados con el método cinético-fluorimétrico propuesto a los 30 minutos.

Muestra	Peso (g)	$\Delta I_{548 \text{ nm, 30 min}}$ $\pm ds$	[MA] <sub>30 min</sub> $\pm ds$ $^*(\mu\text{M})$	No. TBA <sub>30 min</sub> $\pm ds$ mgMA/kg	% Rec.
A	10.2330	630 $\pm$ 50	0.14 $\pm$ 0.01	0.098 $\pm$ 0.0007	
B	10.2892	3790 $\pm$ 80	1.58 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.02	96
C	10.6290	3700 $\pm$ 100	1.54 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.03	93.3

\*Esta es la concentración de MA de la dilución en la celda.



## 8. Método Propuesto

**Tabla VIII.7.** Concentración de MA No. de TBA y % de recuperación para las muestras de chuleta ahumada de puerco determinados con el método cinético-fluorimétrico propuesto a los 15 minutos.

Muestra	Peso (g)	$\Delta I_{648 \text{ nm}, 15 \text{ min}}$ $\pm ds$	$[MA]_{15 \text{ min}} \pm ds^*$ ( $\mu\text{M}$ )	No. TBA <sub>15 min</sub> $\pm ds$ mgMA/kg	% Rec.
D	9.9844	180 $\pm$ 30	0.048 $\pm$ 0.003	0.035 $\pm$ 0.002	
E	9.5231	930 $\pm$ 10	1.30 $\pm$ 0.01	0.983 $\pm$ 0.007	83.46
F	9.6675	970 $\pm$ 40	1.36 $\pm$ 0.06	1.0128 $\pm$ 0.04	87.46

\*Esta es la concentración de MA de la dilución en la celda.

**Tabla VIII.8.** Concentración de MA No. de TBA y % de recuperación para las muestras de chuleta ahumada de puerco determinados con el método cinético-fluorimétrico propuesto a los 30 minutos.

Muestra	Peso (g)	$\Delta I_{648 \text{ nm}, 30 \text{ min}}$ $\pm ds$	$[MA]_{30 \text{ min}} \pm ds^*$ ( $\mu\text{M}$ )	No. TBA <sub>30 min</sub> $\pm ds$ mgMA/kg	% Rec.
D	9.9844	450 $\pm$ 80	0.057 $\pm$ 0.006	0.041 $\pm$ 0.004	
E	9.5231	2650 $\pm$ 40	1.13 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.01	71.53
F	9.6675	2490 $\pm$ 80	1.06 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.02	66.86

\*Esta es la concentración de MA de la dilución en la celda.



## 8. Método Propuesto

### 8.2 Comparación con el Método Espectrofotométrico Tradicional

Por otro lado, se determinó MA en los mismos extractos por espectrofotometría. Una alícuota de 2 mL de extracto se puso a reaccionar con 2 mL de TBA 0.03 M en un baño de agua a 94°C por 15 min, se enfrió la mezcla en agua y hielo y se midió la absorbancia de la solución a 532 nm.

Para esta parte se preparó una curva patrón de MA de concentración 0.1 a 10 µM haciendo reaccionar 2 mL de soluciones de MA (en ácido perclórico 0.1 M) con 2 mL de TBA 0.03 M. Las mezclas de reacción se trataron igual que las muestras. En la **tabla VIII.9** y la **figura 8.3** se presentan los datos de esta curva.

**Tabla VIII.9.** Curva patrón de MA determinando el Producto TMT por espectrofotometría.

[MA] µM	A <sub>532 nm</sub>
0	0
0.1	0.0165
0.7	0.1045
1.0	0.1782
5.0	0.8828
8.0	1.3829
10.0	1.6906

Del ajuste que se muestra en la **figura 8.3** se tiene que la ecuación para la curva patrón es:

$$A_{532nm} = (0.002 \pm 0.009) + (0.171 \pm 0.002)[MA] \quad (8.1)$$

donde [MA] es µM.



## 8. Método Propuesto

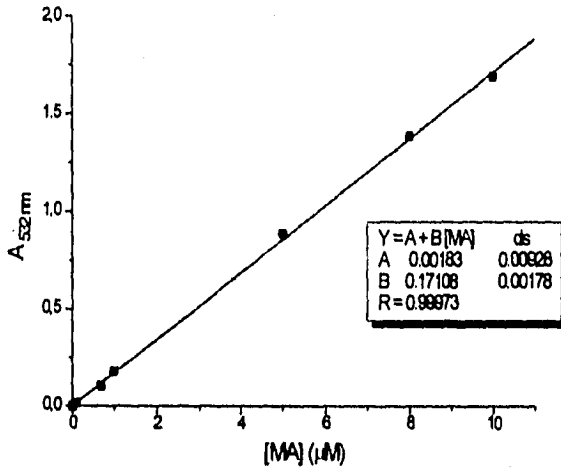


Figura 8.3. Curva patrón de MA determinado por espectrofotometría.

Los datos obtenidos para las muestras se presentan en la tabla VIII.10.

Tabla VIII.10. Absorbancias de las mezclas de reacción de los extractos de carne de res y chuleta ahumada de puerco con TBA. [TBA]=0.015 M. y [HClO<sub>4</sub>]=0.05 M.

Res	A <sub>532nm</sub>	Chuleta	A <sub>532nm</sub>
A1	0.0345	D1	0.0228
A2	0.0362	D2	0.0205
A3	0.0376	D3	0.0227
B1	0.2139	E1	0.2107
B2	0.2050	E2	0.2137
B3	0.2098	E3	0.2085
C1	0.2009	F1	0.2278
C2	0.1954	F2	0.2265
C3	0.1955	F3	0.2179



## 8. Método Propuesto

En las tablas VIII.11 y VIII.12 se muestran los resultados de la determinación de MA por espectrofotometría.

**Tabla VIII.11.** No. TBA y % de recuperación de MA para carne de res. determinación espectrofotométrica.

Muestra	Peso (g)	$A_{632nm} \pm ds$	$[MA] \pm ds^*$ ( $\mu M$ )	No. TBA $\pm ds$ mgMA/kg	% Rec.
A	10.2330	$0.036 \pm 0.001$	$0.20 \pm 0.01$	$0.141 \pm 0.007$	
B	10.2892	$0.209 \pm 0.004$	$1.21 \pm 0.02$	$0.85 \pm 0.01$	67.33
C	10.6290	$0.197 \pm 0.002$	$1.19 \pm 0.01$	$0.806 \pm 0.007$	66

**Tabla VIII.12.** No. TBA y % de recuperación de MA para chuleta ahumada de puerco. determinación espectrofotométrica.

Muestra	Peso (g)	$A_{632nm} \pm ds$	$[MA] \pm ds^*$ ( $\mu M$ )	No. TBA $\pm ds$ mgMA/kg	% Rec.
D	9.9844	$0.022 \pm 0.001$	$0.117 \pm 0.005$	$0.084 \pm 0.004$	
E	9.5231	$0.210 \pm 0.002$	$1.22 \pm 0.01$	$0.9220 \pm 0.007$	73.53
F	9.6675	$0.224 \pm 0.004$	$1.30 \pm 0.02$	$0.97 \pm 0.01$	78.86

La inspección de los resultados obtenidos muestra que la concentración de MA calculada con el método nuevo depende del tipo de la curva patrón, pues los valores calculados utilizando  $\Delta t_{15 \text{ min}}$  difieren de los calculados con  $\Delta t_{30 \text{ min}}$  más allá de los límites del error. Para la muestra de carne de res las diferencias son muy grandes, llegando a un nivel del 50%, mientras que en el caso de chuleta las diferencias están alrededor del 20%. La recuperación en el caso de la muestra de carne es de más del 100 %, tomando en cuenta



## 8. Método Propuesto

los resultados a los 15 min. y para chuleta de puerco la recuperación es considerablemente menor al 100%, entre 60 y 80% que es lo típico para el método del TBA en carnes (Raharjo *et al.*, 1993). En realidad, se observa el mismo nivel de recuperación empleando la metodología tradicional espectrofotométrica para las mismas muestras, **tablas VIII.11 y VIII.12.**

La comparación de los resultados de la determinación de MA con el método nuevo a temperatura ambiente con lo obtenidos por espectrofotometría, muestran un acuerdo satisfactorio considerando que cada método tiene sus errores sistemáticos. Si tomamos los valores promedio de las determinaciones a 15 y 30 minutos, obtenemos que para la muestra de carne el No. TBA promedio es  $0.12 \pm 0.03$  mg/kg y por espectrofotometría este parámetro es igual a  $0.140 \pm 0.08$  mg/kg, es decir, que ambos coinciden dentro de los límites del error; para chuleta el No. TBA promedio es  $0.038 \pm 0.004$  mg/kg y por espectrofotometría este parámetro es igual a  $0.084 \pm 0.004$  mg/kg, es decir dos veces mayor. Sin embargo en este caso la cantidad de MA está en el límite de detección por espectrofotometría, cuando el error de la curva patrón a una concentración de este nivel es aproximadamente  $\pm 50\%$ , como puede evaluarse en la ecuación (8.1). Es decir, el error de reproducibilidad mostrado en la **tabla VIII.12**, no refleja el error real, que es mayor al 50% y de hecho los resultados de ambos métodos están también en los límites del error.



## 9. Conclusiones

### 9. Conclusiones

1. En base al estudio cinético se propuso un mecanismo de la reacción entre MA y TBA el cual está constituido por dos etapas consecutivas; la primera es la condensación bimolecular de TBA con un grupo carbonilo del MA formando un intermediario sin color, y la segunda es la condensación también bimolecular de otra molécula de TBA con el segundo grupo carbonilo del MA para formar el producto final de color rosado.

2. Las micelas de diferentes tensoactivos, anilina y iones  $\text{Cu}^{2+}$  no sirvieron como catalizadores de la reacción.

3. Las ciclodextrinas fortalecen considerablemente la fluorescencia del producto de la condensación MA-TBA.

4. La determinación fluorimétrica del producto de condensación en presencia de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) tiene un límite de detección de 0.8 nM, que es el más bajo de todos los publicados a la fecha que están alrededor de 0.1  $\mu\text{M}$  en fluorimetría y 0.3 mM para espectrofotometría.

5. Se propuso un nuevo método cinético-fluorimétrico, que permite determinar hasta 0.1  $\mu\text{M}$  de MA de MA sin necesidad de calentar la mezcla de reacción.

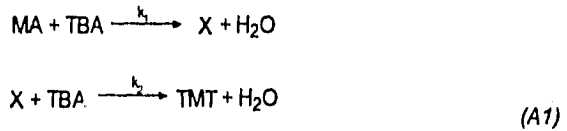


## 10. Apéndices

### 10 Apéndices

#### Apéndice A

De acuerdo con el esquema:



para la velocidad de formación y transformación de X tenemos:

$$\frac{d[\text{X}]}{dt} = k_1[\text{TBA}][\text{MA}] - k_2[\text{X}][\text{TBA}] \quad (\text{A2})$$

con TBA en exceso:

$$\frac{d[\text{X}]}{dt} = k'_1[\text{MA}] - k'_2[\text{X}] \quad (\text{A3})$$

donde:

$$k'_1 = k_1[\text{TBA}], \quad k'_2 = k_2[\text{TBA}] \quad (\text{A4})$$

Para resolver la ecuación (A3) se utiliza el método de "la constante variable". Es decir, inicialmente se busca la solución de la ecuación con  $k'_1[\text{MA}]=0$ .

$$\frac{d[\text{X}]}{dt} = -k'_2[\text{X}] \quad (\text{A5})$$

$$[\text{X}] = \text{Z}e^{-k'_2 t} \quad (\text{A6})$$

Luego, la constante Z se trata como una variable para la ecuación completa:





## 10. Apéndices

$$\begin{aligned}\frac{d[X]}{dt} &= \frac{dZ}{dt} e^{-k_2 t} + Z \frac{d(e^{-k_2 t})}{dt} = \frac{dZ}{dt} e^{-k_2 t} - k_2 Z e^{-k_2 t} = \\ &= \frac{dZ}{dt} e^{-k_2 t} - k_2 [X] = k_1 [MA] - k_2 [X]\end{aligned}\quad (A7)$$

de aquí tenemos:

$$\frac{dZ}{dt} e^{-k_2 t} = k_1 [MA] \quad (A8)$$

Por otra parte, la concentración de MA puede calcularse de la ecuación

$$\frac{d[MA]}{dt} = -k_1 [MA] \quad (A9)$$

donde  $k_1$  incluye a [TBA] que se considera una constante porque se encuentra en exceso en el medio de reacción.

Considerando como condición inicial  $[MA]_{t=0} = [MA]_0$  (A9) da

$$[MA] = [MA]_0 e^{-k_1 t} \quad (A10)$$

Combinando las ecuaciones A8 y A10 se tiene la siguiente expresión:

$$\frac{dZ}{dt} e^{-k_2 t} = k_1 [MA]_0 e^{-k_1 t} \quad (A11)$$



## 10. Apéndices

ó

$$\frac{dZ}{dt} = k'_1 [MA]_0 e^{(k'_2 - k'_1)t} \quad (A12)$$

La última ecuación es una ecuación diferencial para Z, cuya solución tiene la forma:

$$Z = k'_1 [MA]_0 e^{(k'_2 - k'_1)t} \frac{1}{k'_2 - k'_1} + Y \quad (A13)$$

donde Y es una constante de integración que hay que calcular en las condiciones iniciales. Introduciendo (A13) en (A6) se tiene:

$$[X] = \frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1} e^{-k'_1 t} + Y e^{-k'_2 t} \quad (A14)$$

La condición inicial es que  $[X]_{t=0} = 0$

$$0 = \frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1} + Y$$

$$Y = -\frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1}$$

y finalmente:



## 10. Apéndices

$$\begin{aligned}
 [X] &= \frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1} e^{-k'_1 t} - \frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1} e^{-k'_2 t} = \\
 &= \frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1} (e^{-k'_1 t} - e^{-k'_2 t}) \quad (A15)
 \end{aligned}$$

Puede obtenerse la ecuación cinética para el TMT de las ecuaciones diferenciales, utilizando la ecuación del balance de masa:

$$[TMT] = [MA]_0 - [MA] - [X] \quad (A16)$$

Con las ecuaciones (A10) y (A16) tenemos:

$$\begin{aligned}
 [TMT] &= [MA]_0 - [MA]_0 e^{-k'_1 t} - \frac{k'_1 [MA]_0}{k'_2 - k'_1} (e^{-k'_1 t} - e^{-k'_2 t}) = \\
 &= [MA]_0 \left( 1 - \frac{k'_2 e^{-k'_1 t} - k'_1 e^{-k'_1 t} + k'_1 e^{-k'_1 t} - k'_1 e^{-k'_2 t}}{k'_2 - k'_1} \right) = \\
 &= [MA]_0 \left( 1 - \frac{k'_2 e^{-k'_1 t} - k'_1 e^{-k'_2 t}}{k'_2 - k'_1} \right) = \\
 &= [MA]_0 \left( 1 - \frac{k'_1 e^{-k'_2 t} - k'_2 e^{-k'_1 t}}{k'_1 - k'_2} \right) \quad (A17)
 \end{aligned}$$

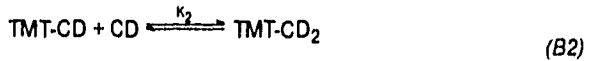
Esta ecuación se menciona en el capítulo número 5, Cinética de la Reacción TBA-MA, donde se nombra como ecuación (5.3).



## 10. Apéndices

### Apéndice B

Al parecer, el producto TMT se une a la  $\alpha$ -CD dando los siguientes equilibrios:



La fluorescencia del producto TMT está dada por:

$$I_{\text{obs}} = I_{\text{TMT}} + I_{\text{TMT-CD}} + I_{\text{TMT-CD}_2} \quad (B3)$$

donde  $I_{\text{obs}}$  es la intensidad observada y corresponde a la suma de la intensidad de fluorescencia del producto TMT libre y la intensidad de fluorescencia del producto TMT unido con una y dos moléculas de  $\alpha$ -CD.

Con la ecuación (4.8) (ver Capítulo 4) tenemos:

$$I_{\text{obs}} = i_{\text{TMT}} [\text{TMT}] + i_{\text{TMT-CD}} [\text{TMT-CD}] + i_{\text{TMT-CD}_2} [\text{TMT-CD}_2] \quad (B4)$$

Por otro lado, el balance de materia para el TMT es:

$$[\text{TMT}]_0 = [\text{TMT}] + [\text{TMT-CD}] + [\text{TMT-CD}_2] \quad (B5)$$

y considerando los equilibrios (B1) y (B2)



## 10. Apéndices

$$[TMT]_0 = [TMT] \{1 + K_1[CD] + K_1 K_2 [CD]^2\}$$

de aquí se tiene:

$$[TMT] = \frac{[TMT]_0}{1 + K_1[CD] + K_1 K_2 [CD]^2}, \quad (B6)$$

$$[TMT - CD] = \frac{K_1 [TMT]_0 [CD]}{1 + K_1[CD] + K_1 K_2 [CD]^2} \quad \text{y} \quad (B7)$$

$$TMT - CD_2 = \frac{K_1 K_2 [TMT]_0 [CD]^2}{1 + K_1[CD] + K_1 K_2 [CD]^2} \quad (B8)$$

con esto la ecuación (B4) queda:

$$I_{ob} = \frac{i_{1M} + i_{1M-CD} [CD] K_1 + i_{1M-CD_2} K_1 K_2 [CD]^2}{1 + K_1[CD] + K_1 K_2 [CD]^2} [TMT]_0$$

y en las condiciones del experimento,

$$K_1[CD] \ll 1; \quad \text{y} \quad K_2[CD]^2 \ll 1$$

(B4) se simplifica a:

$$I_{ob} = I_0 + I_{1M-CD} K_1 [CD] + I_{1M-CD_2} K_1 K_2 [CD]^2$$

Esta es la ecuación (7.1) del Capítulo 7.



## 11. Bibliografía

### 11 Bibliografía

1. Albro, P. W.; Corbett, J. T. and Schroeder, J. L. (1986). Application of the Thiobarbituric Acid Assay to the Measurement of Lipid Peroxidation Products in Microsomes. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **13**, 185-194.
2. Allen, J. C.; Hamilton, R. J. (1989). *Rancidity in Foods*, Elsevier, London & N. Y.
3. Almandós, M. E.; Giannini, D. H.; Ciarlo, A. S.; Boeri, R. L. (1986). Formaldehyde as an Interference of the 2-Thiobarbituric Acid Test. *J. Sci. Food Agric.* **37**, 54-58.
4. Amis, E. S. & Hinton, J. F. (1973). *Solvent Effects of Chemical Phenomena Vol. 1*, Academic Press, New York and London.
5. Badul, S. (1993). *Química de los Alimentos*, Alhambra, México.
6. Basu, A.; Marnett, L. (1984). Unequivocal Demonstration that Malonaldehyde is a Mutagen. *Carcinogenesis* **4**, 331-333.
7. Bender, M. L.; Komiya, M. (1978). *Cyclodextrin Chemistry*; Springer-Verlag; Heidelberg.
8. Blandamer, M. J.; Burgess, J.; Ross, E. R.; Scott, J. W. (1982). Dependence of Equilibrium and Rate Constants on Temperature and Pressure. *Chem. Rev.* **82**, 259-286.
9. Bird, R. P.; Hung, S. S. O.; Hadley, M.; Draper, H. H. (1983). Determination of Malonaldehyde in Biological Materials by High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **128**, 240-244.



## 11. Bibliografía

10. Bird R. P.; Draper H. H. (1984). Comparative Studies on Different Methods of Malondialdehyde Determination. *Meth. Enzym.* **105**, 299-305.
11. Bunton, C. A., and Wolf, B. (1973). The Problem of pH in Micellar Catalyzed Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 3742-3749.
12. Careche, M.; Tejada, M. (1988). Interference by Formaldehyde in the 2-Thiobarbituric Acid Test for Rancidity. *J. Sci. Food Agric.* **43**, 49-57.
13. Chio, K.; Tappel, A. (1969). Synthesis and Characterization of the Fluorescent Products Derived from Malondialdehyde and Amino Acids. *Biochem.* **8**, 28221-2826.
14. Du, Z.; Bramlage, W. J. (1992). Modified Thiobarbituric Acid Assay for Measuring Lipid Oxidation in Sugar-Rich Plant Tissue Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1566-1570.
15. Draper, H. H.; Polensek, L.; Hadley, M.; McGirr, L. G. (1984). Urinary Malondialdehyde as an Indicator of Lipid Peroxidation in the Diet and in the Tissues. *Lipids.* **19**, 836-843.
16. Espinosa-Mansilla, A.; Durán, I.; Salina, F. (1996). Kinetic Behaviour of the Malonaldehyde-Thiobarbituric Acid-Reaction. Kinetic-Fluorimetric Determination of Malonaldehyde in Human Serum. *Anal. Chim. Acta*, **320**, 125-132.
17. Fennema, O. R. (1985). *Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York.
18. Frankewich, R. P.; Thimmaiah, K. N. and Hinze, W. L. (1991). Evaluation of the Relative Effectiveness of Different Water-Soluble  $\beta$ -Cyclodextrin Media to Function as Fluorescence Enhancement Agents. *Anal. Chem.* **63**, 2924-2933.



## 11. Bibliografía

19. Gray, J. I.; Monahan, F. J. (1992). Measurement of Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Trends Food Sci.* **3**, 315-319.
20. Gutteridge, J. M. C.; Quinlan, G. J. (1983). Malonaldehyde Formation from Lipid Peroxides in the Thiobarbituric Acid Test: The Role of Lipid Radicals, Iron Salts, and Metal Quelators. *Appl. Biochem.* **5**, 293-299
21. Heath, R. L.; Packer, L. (1968). Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 189-198.
22. Ikatsu, H.; Nakajima, T.; Murayama, N. and Korenaga, T. (1992). Flow-Injection Analysis for Malondialdehyde in Plasma with the Thiobarbituric Acid Reaction. *Clin. Chem.* **38**, 2061-2065.
23. Jencks, W. P. (1987). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*; Dover, New York.
24. Lehn, J.-M. (1993). Supramolecular Chemistry. *Science.* **260** 1762-1763.
25. Lehn, J.-M. (1995). *Supramolecular Chemistry Concepts and Perspectives*, VCH, Federal Republic of Germany.
26. Li, S.; Purdy, W. C. (1992). Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. *Chem. Rev.* **92**, 1457-1470.
27. Kamarei, A. R.; Karel, M. (1984). Assesment of Autoxidation in Freeze-Dried Meats by a Fluorescence Assay. *J. Food Sci.* **49**, 1517-20, 1524.





## 11. Bibliografía

28. Ke, P. J.; Cervantes, E., Robles-Martinez, C. (1984). Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in Tissues by an Improved Distillation Spectrophotometric Method. *J. Sci. Food Agric.* **35**, 1248-1254.
29. Melton, S. L. (1983). Methodology for Following Lipid Oxidation in Muscle Foods. *Food Technol.* **37**, 105-116.
30. Nickos, A. B.; Dimitrios, J. F.; Georgios, E. P.; Vassilios, N. V.; Antonios, J. M.; Antonios, G. T. (1994). Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food and Feedsuff Samples. *J. Agric. Chem.* **42**, 1931-1937.
31. Paton, S.; Keeney, M. and Kurtz, G. W. (1951) *JAOCS* **28**, 391
32. Pegg, R. B.; Shahidi, F.; Jablonnski, C. R. (1992). Interactions of Sulfanilamide and 2-Thiobarbituric Acid with Malonaldehyde: Structure of Adducts and Implications in Determination of Oxidative State of Nitrite-Cured Meats. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1826-1832.
33. Pikul, J.; Leszynski, D. E.; Kummerow, F. A. (1983). Elimination of Sample Autoxidation by Butylated Hydroxytoluene Additions before Thiobarbituric Acid Assay for Malonaldehyde in Fat from Chicken Meat. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 1338-1342.
34. Pikul, J.; Leszynski, D. E.; Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of Three Modified TBA Methods for Measuring Lipid Oxidation in Chicken Meat. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1309-1313.



## 11. Bibliografía

35. Raharjo, S.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R. (1992). Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C<sub>18</sub> Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2182-2185.
36. Raharjo, S.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R. (1993). Solid-Phase Acid Extraction Improves Thiobarbituric Acid Method to Determine Lipid Oxidation. *J. Food Science.* **58**, 921-924, 932.
37. Rhee, K. S. (1978). Minimization of Further Lipid Peroxidation in the Distillation 2-Thiobarbituric Acid Test of Fish and Meat. *J. Food Sci.* **43**, 1776-1778, 1781.
38. Richard, M. J.; Portal, B.; Meo, J.; Coudray, Ch.; Hadjian, A.; Favier, A. (1992). Malondialdehyde Kit Evaluated for Determining Plasma and Lipoprotein Fractions that React with Thiobarbituric Acid. *Clin Chem.* **38**, 704-709
39. Salih, A. M.; Smith, D. M.; Price, J. F.; Dawson, L. E. (1987). Modified Extraction 2-Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Oxidation in Poultry. *Poult. Sci.* **66**, 1483-1488.
40. Serjeant, E. P.; Dempsey, B. (1979). *Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solutions* IUPAC, Pergamon Press, UK.
41. Tarladgis, B. G.; Watts, B. M.; Younathan, M. T.; Dugan, L. R., Jr. (1960). A Distillation Method for the quantitative Determination of Malonaldehyde In Rancid Foods. *J. Am. Oil Chem Soc.* **37**, 44-48.
42. Tomás, M. C.; Funes, J. (1987). Application of 2-Thiobarbituric Acid Reaction to Exudates of Frozen and Refrigerated Meats. *J. Food Sci.* **52**, 575-579.



## 11. Bibliografía

- 43 Turner, E. W.; Paynter, W. D.; Montie, E. J.; Bessert, M.; Struck, G. M.; Olson, F. C. (1954). Use of the 2-Thiobarbituric Acid Reagent to Measure Rancidity in Frozen Pork. *Food Technol.* **8**, 326-330.
44. Uchiyama, M.; Mihara, M. (1978). Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Anal. Biochem.* **86**, 271-278
45. Wade, C.R.; Van Rij, A. M. (1985). In Vivo Lipid Peroxidation in Man as Measured by the Respiratory Excretion of Ethane, Pentane, and Other Low-Molecular-Weight Hydrocarbons. *Anal Biochem.* **150**, 1-7.
46. Wasowicz, W.; Néve, J.; and Peretz, A. (1993). Optimized Steps in Fluorimetric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clin Chem.* **39**, 2522-2526.
47. Willard, H. H.; Lynne, L. M. Jr.; Dean J. A.; Settle F. A. Jr. (1988). *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth Publishing Company, USA.
48. Witte, V. C.; Krause, G. F.; Bailey, M. E. (1970). A New Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values of Pork and Beef During Storage. *J. Food Sci.* **35**, 582-585.
49. Wong, D. W. S. (1989). *Lipids. in Mechanism and Theory in Food Chemistry*, Van Nostrand Reinhold, New York.
50. Yagi, K.; Yagi, K. (1982) *Lipids Peroxides in Biology and Medicine*, Academic Press, New York.



## 11. Bibliografía

51. Yagi, K. (1984). Assay for Blood plasma or Serum. *Methods Enzymol.* **105**, 328-331.

52. Yatsimirski, A. K.; Yatsimirskaya, N. T. and Kashina, S. B. (1994). Micellar Catalysis and Product Stabilization in Hidrazone Formation Reactions and Micellar Modified Determination of Hydrazine and Phenylhydrazine. *Anal Chem.* **66**, 2232-2239.

