



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Métodos Instrumentales



Elisa **Vega Ávila**

José Ramón **Verde Calvo**

Frida Pura **Malpica Sánchez**

María del Carmen **Pérez César**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. José Octavio Nateras Domínguez
Rector

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La purísima
Iztapalapa, 09340. México, D. F.

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Presentación	5
Tema I	Instrucciones generales de laboratorio 7
	Seguridad en el laboratorio 7
	1.1 Reglas de seguridad 7
	1.2 Normas particulares de trabajo 9
	1.3 Reactivos químicos en el laboratorio 10
	1.4 Simbología para denotar los riesgos de los reactivos químicos 11
	1.5 Código de colores para tuberías de servicios en los laboratorios de docencia e investigación 13
Bibliografía	14
Tema II	Matemáticas básicas en el laboratorio 15
	2.1 Sistema internacional de unidades 15
	2.2 Cifras Significativas 16
	2.3 Resolución de ecuaciones simultáneas con dos incógnitas 17
	2.3.1 Método de suma y resta 17
	2.3.2 Método de igualación 18
	2.3.3 Método de sustitución 18
	2.3.4 Método de determinantes 19
Bibliografía	20
Tema III	Estadística en el laboratorio 21
	3.1 Introducción 21
	3.2 Precisión y exactitud 21
	3.3 La Media aritmética 22
	3.4 Error experimental 22
	3.5 Desviación estándar 23
	3.6 Mínimos cuadrados 23
Bibliografía	28

Tema IV	Fundamentos de cromatografía	29
	Práctica 1. Separación de colorantes por cromatografía de placa fina y columna	29
	Bibliografía	33
Tema V.	Cromatografía de gases	35
	Práctica 2. Determinación de etanol en tequila/bebida alcohólica destilada, empleando el método de estándar externo	35
	Bibliografía	40
Tema VI	Cromatografía de líquidos de alta resolución	41
	Práctica 3. Determinación de ácido gálico empleando el método de estándar interno	41
	Bibliografía	46
Tema VII	Electroforesis	47
	Práctica 4. Separación de aminoácidos en zumo de frutas.	47
	Bibliografía	50
Tema VIII	Espectrofotometría.	51
	Práctica 5. Determinación de nitrito en agua	51
	Bibliografía	53
	Práctica 6. Análisis de mezclas	55
	Bibliografía	58
	Práctica 7. Determinación del pka del azul de bromotimol	59
	Bibliografía	61
Tema IX	Radiactividad (práctica demostrativa)	63
	Práctica 8. Radiactividad natural presente en el ambiente	63
	Bibliografía	67

Presentación

El presente manual tiene como objetivo apoyar el curso teórico-práctico de la Unidad de Enseñanza Aprendizaje de Métodos Instrumentales que se imparte en séptimo trimestre de la licenciatura en Biología Experimental. El material está elaborado pensando en el sistema trimestral de la Universidad Autónoma Metropolitana.

En este manual se abordan los temas de cromatografía de líquidos tradicionales, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, electroforesis, espectrofotometría y radiactividad.

El texto se compone por 8 prácticas, estructuradas con objetivo, introducción, material y reactivos, técnicas, tratamiento de datos experimentales, cuestionario y bibliografía.

Para la obtención e interpretación de los resultados, se recomienda relacionar los conceptos teóricos con las actividades experimentales.

Cabe mencionar que el manual también contiene 3 capítulos relacionados con las instrucciones generales de laboratorio, matemáticas básicas en el laboratorio y estadística en el laboratorio.

Los autores

Tema I

Instrucciones Generales de Laboratorio

Seguridad en el Laboratorio

1.1 Reglas de seguridad

El laboratorio debe ser un lugar seguro para trabajar, los accidentes se pueden originar por negligencia en la prevención, descuidos, bromas o por circunstancias fuera de control. La seguridad es un conjunto de medidas técnicas, educacionales, médicas y psicológicas empleadas para prevenir accidentes, tendientes a eliminar las condiciones inseguras del ambiente y a instruir o convencer a las personas acerca de la necesidad de implementar prácticas preventivas (Verde y cols., 2013).

Para garantizar seguridad en el laboratorio se deberán tener siempre presentes los posibles peligros asociados al trabajo con reactivos químicos y conocer las medidas de seguridad que se aplican a estos lugares de trabajo.

Todas las personas que se encuentran en un laboratorio químico deben conocer y observar las siguientes reglas (Shugar & Ballinger, 1990).

1. Nunca trabaje en el laboratorio solo o sin la supervisión de su profesor. En caso de ocurrir un accidente necesitará el auxilio de alguna persona.
2. Nunca realice un experimento sin conocer las reglas de seguridad y procedimientos que se aplican al trabajo del laboratorio. Es conveniente investigar el potencial dañino de los materiales químicos a utilizar en los experimentos, esto se puede hacer en los manuales apropiados sobre productos químicos, equipo y procedimiento.
3. Nunca realice un experimento sin utilizar la ropa y accesorios de protección personal. En los laboratorios de química es común el uso de la bata, lentes de seguridad, guantes de diferentes materiales, mascarilla y zapatos apropiados. Las características de estos elementos de seguridad se indican a continuación.

Bata. Debe ser de algodón, de manga larga, 1 ó 2 tallas más grande de la talla habitual que usa el alumno y debe contar con todos los botones para mantenerla cerrada (Fig. 1).



Figura No. 1. La bata de laboratorio es obligatoria.

Lentes de seguridad. También llamados gafas, “goggles”, o anteojos panorámicos, deben proteger toda la superficie frontal y lateral de los ojos y ser de un material transparente que permita una completa visibilidad (Fig. 2).



Figura No. 2. Lentes de seguridad para el manejo de sustancias corrosivas como los ácidos fuertes.

Mascarilla. Protege las vías respiratorias de polvos y/o vapores tóxicos o corrosivos. Las hay con diferentes filtros, para polvos finos, vapores orgánicos y ácidos (Fig. 3).



Figura No. 3. Mascarilla protectora contra polvos y/o vapores tóxicos o corrosivos.

Guantes. Los hay de diferentes materiales, de látex o neopreno para el trabajo habitual de laboratorio, de asbesto para sujetar objetos calientes y de neopreno para manejo de ácidos (Fig. 4).



Para objetos calientes



Para manejo de ácidos

Figura No. 4. Diferentes tipos de guantes para uso en el laboratorio.

Zapato. Se recomienda usar zapato cerrado, de suela antiderrapante. La zapatilla de tacón alto, las sandalias y en general los zapatos abiertos no se consideran adecuados para trabajo de laboratorio.

4. Se recomienda traer el cabello recogido, evitar el uso de anillos, pulseras y gorras, y en el caso de las mujeres, las uñas largas no son apropiadas para el trabajo de laboratorio y no se recomienda el uso de medias.
5. Nunca trabaje sin conocer la localización y operación de todos los equipos de emergencia de los laboratorios. Los equipos de emergencia son: disolución para lavar los ojos, depósito de agua, extinguidores, alarmas de incendio, salida de emergencia, aparato para administrar respiración artificial, etc. Es importante conocer cuál es la forma de obtener ayuda durante las emergencias, los procedimientos de evacuación y sistemas de alarmas.

6. Toda herida o quemadura, aún los pequeños cortes, que se produzcan durante una práctica deben ser informados obligatoriamente al docente y deberán ser tratadas inmediatamente. En el caso de salpicaduras de ácidos sobre la piel lavar inmediatamente con agua abundante, teniendo en cuenta que en el caso de ácidos concentrados la reacción con el agua puede producir calor. Es conveniente retirar la ropa de la zona afectada para evitar que el corrosivo quede atrapado entre ésta y la piel.
7. No consuma alimentos o bebidas, ni corra, fume, se maquille o manipule lentes de contacto en el laboratorio, aún cuando no se estén realizando prácticas.
8. No pipetee las soluciones con la boca. Use una propipeta o un aspirador que proporcione el vacío, como una jeringa de plástico conectado a la pipeta por una manguera de plástico.
9. No se permiten juegos o bromas. Nunca se debe distraer a otras personas que estén trabajando en el laboratorio o hacer bromas con los compresores de aire, reactivos químicos, etc.
10. Mantenga su área de trabajo limpia y ordenada. No se deben colocar libros, abrigos y mochilas sobre las mesas de trabajo. Se deberá verificar que la mesa esté limpia al iniciar y al terminar el trabajo realizado.
11. No se permite el uso de audífonos durante la práctica.
12. Las visitas no están permitidas.

1.2 Normas particulares de trabajo

Las normas que se deben seguir en los laboratorios de química (Verde y cols., 2013) son.

1. Las balanzas deben dejarse en ceros y perfectamente limpias después de su uso.
2. Cerca de las balanzas sólo deberán estar los estudiantes que en ese momento se encuentren pesando (uno por balanza).
3. Las pipetas con reactivo residual, se deberán colocar con la punta hacia abajo sobre la tarja de cada mesa de trabajo y los alumnos no deberán trasladarlas de un lado a otro para evitar riesgos de salpicaduras a sus compañeros.
4. Siempre que trabaje con algún reactivo tóxico o corrosivo (como los ácidos fuertes), deberá realizar la operación en la campana de extracción, con la luz y el extractor encendidos, y el vidrio protector abajo dejando un espacio para poder manipular el reactivo.
5. Siempre que diluya un ácido fuerte con agua deberá hacerlo de la siguiente manera. Coloque en el matraz volumétrico o recipiente de vidrio donde va a llevar a cabo la dilución, la mitad del volumen total de agua indicado en la preparación del reactivo, añada el ácido manteniendo el recipiente receptor en un cierto ángulo que asegure que la boca del recipiente señale hacia el lado contrario de su cara o la de su compañero. **iNunca añada agua al ácido!**

6. Se deberá etiquetar todo el material de vidrio con el nombre del reactivo, la concentración a la que esté preparado, fecha y nombre o número de equipo.
7. Los frascos de los reactivos deben cerrarse inmediatamente después de su uso, durante su utilización los tapones o las tapas deben colocarse siempre boca arriba sobre la mesa.
8. No deben manipularse jamás productos o disolventes inflamables en las proximidades de un mechero encendido o de la flama de un encendedor.
9. Al agitar moderadamente un tubo de ensayo golpee con la punta del dedo la base del tubo. Cuando requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de rosca, nunca lo haga con la mano.
10. Si algún reactivo se derrama, debe retirarse inmediatamente dejando el lugar perfectamente limpio. Las salpicaduras de sustancias básicas deben neutralizarse con un ácido débil (por ejemplo con ácido cítrico) y las de sustancias ácidas con una base débil (por ejemplo con bicarbonato sódico).
11. No deben verterse residuos sólidos en los fregaderos, para ello deben emplearse los recipientes para residuos que se encuentran en el laboratorio.
12. No calentar nunca enérgicamente una disolución. La ebullición debe ser siempre suave, si hay necesidad utilice perlas de vidrio para conseguir una ebullición homogénea y suave.
13. El mechero debe cerrarse una vez utilizado, tanto de la llave del propio mechero como de la toma del gas de la mesa.
14. Las disoluciones y recipientes calientes deben manipularse con cuidado. Para la introducción y extracción de recipientes de muflas, hornos y estufas deben utilizarse pinzas largas (como las que se usan para el manejo de crisoles en las muflas) y/o guantes para manejo de objetos calientes. No meter material de plástico ni material volumétrico.
15. No se deben oler directamente los vapores de sustancias volátiles, cuando se requiera dirija los vapores con las manos hacia la nariz para percibirlos.
16. Después de haber tomado la cantidad deseada de un reactivo, deberá tapar inmediatamente el recipiente.
17. Nunca regrese reactivos (sólidos o líquidos) al recipiente original, a menos que esté seguro de su buen manejo y de que no están contaminados.

1.3 Reactivos químicos en el laboratorio

Las sustancias químicas que se emplean en el laboratorio, son de diversos grados:

Grado técnico o comercial

Su calidad no está garantizada y por ello no se utilizan para análisis químico, pueden usarse en experimentos cualitativos donde no se requiere cuantificar ni obtener resultados exactos.

Grado USP (United States Pharmacopeia)

Cumplen con las especificaciones que exigen las norma de la Farmacopea de Estados Unidos en cuanto a contenidos máximos de contaminantes dañinos a la salud. Pueden contener contaminantes no peligrosos, pero que interfieren en determinados procesos analíticos por lo que su uso no es aconsejable para estos propósitos.

Grado reactivo

Estas sustancias cumplen las especificaciones del Comité de Reactivos Químicos de la Sociedad Química Americana (Reagent Chemical Committee of the American Chemical Society) y son los indicados para el trabajo analítico. Se identifican por las siglas en inglés ACS que aparecen en la etiqueta, la cual además declara el porcentaje máximo de impurezas permitido por dicho Comité internacional, así como el porcentaje de las impurezas que contiene.

Grado estándar primario

Los reactivos estándar o patrón primario son compuestos de elevada pureza, que han sido examinados exhaustivamente (Skoog y cols., 2005).

1.4 Simbología para denotar los riesgos de los reactivos químicos

La adecuada organización, acomodo y rotulado de los compuestos químicos que se utilicen en el laboratorio, es de gran importancia, pues permite reconocer la naturaleza química de una disolución o reactivo de una manera rápida y eficiente. Uno de los sistemas empleados es aquel que utiliza rojo para compuestos inflamables, amarillos para agentes oxidantes, azul para tóxicos, blanco para corrosivos y naranja para materiales relativamente no peligrosos. Además, se utilizan pictogramas o dibujos para indicar las sustancias que reaccionan con el agua así como materiales carcinogénicos (Munchausen & Corkern, 1991). Otros sistemas convencionales que usualmente se emplean para dar a conocer mediante símbolos los riesgos de las sustancias químicas (Verde y cols., 2013) son:

Números de riesgo de la Organización de Naciones Unidas (ONU).

Diamante de la National Fire Protection Association de los Estados Unidos (NFPA).

Sistema del Departamento de Transporte de los Estados Unidos (DOT).

Códigos de riesgo de empresas fabricantes de reactivos químicos, como Merck y Baker.

De los sistemas anteriores el más común es el de NFPA cuyo símbolo es un rombo (Fig. 5) que representa visualmente la información sobre tres categorías de riesgo: salud, inflamabilidad y reactividad; identificadas y clasificadas en una escala del 0 al 4, dependiendo del grado de peligro que presenten. Adicionalmente, señala riesgos específicos como poder oxidante, corrosividad, si se trata de un compuesto radiactivo () , su reactividad con el agua y si tiene carácter ácido, básico o neutro (Harris, 2004., Shugar & Ballinger, 1990).

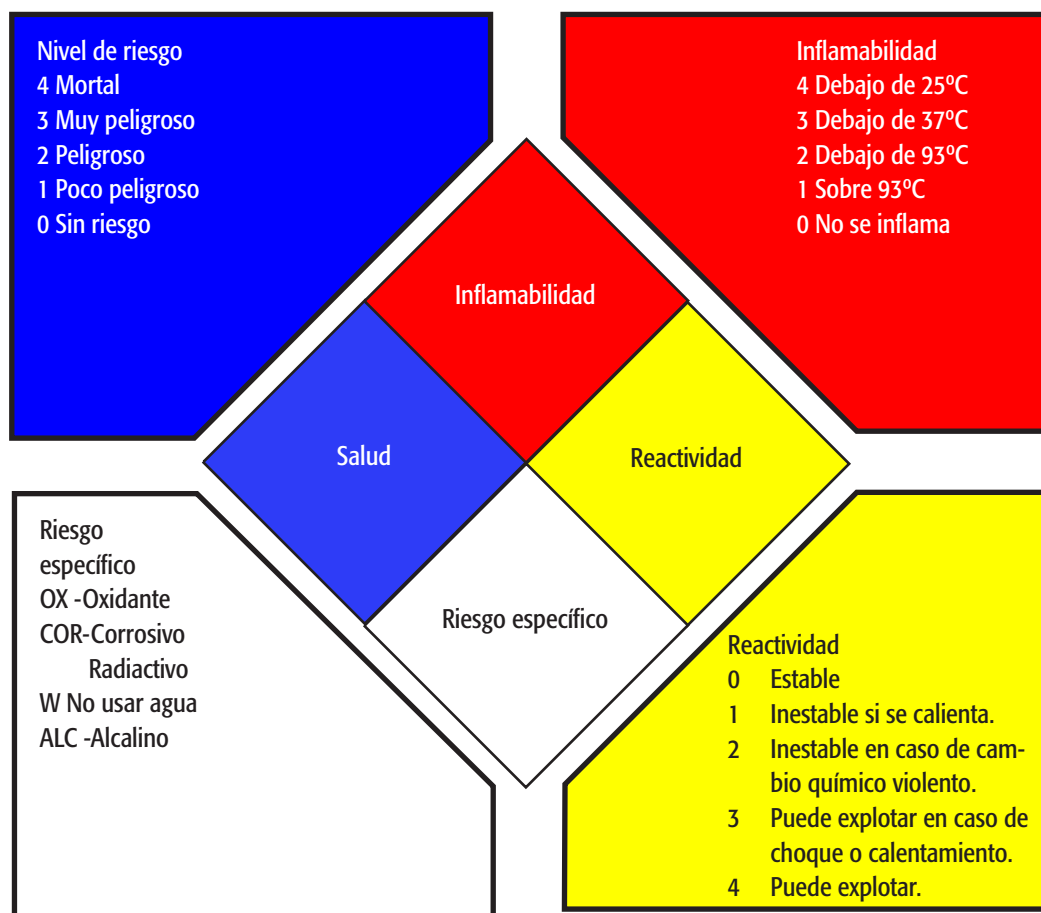


Figura 5. Símbolo en forma de rombo o diamante de la National Fire Protection Association (NFPA).

En cuanto a los símbolos de riesgo empleados por las empresas fabricantes de reactivos químicos, algunos se encuentran ejemplificados en la Fig. 6. Finalmente, la Fig. 7 presenta algunos símbolos de riesgo empleados en laboratorios e industrias.

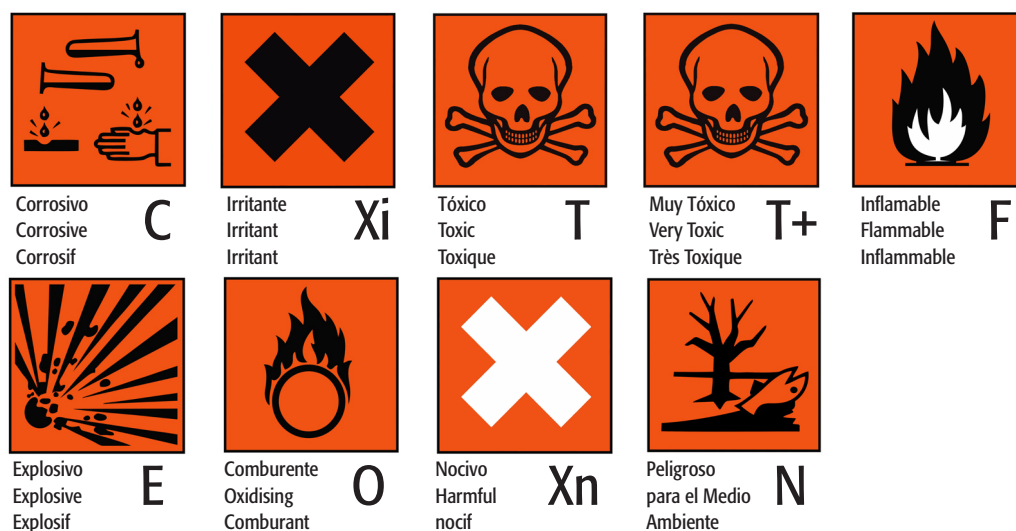


Figura 6. Algunos símbolos de riesgo empleados por las compañías fabricantes de reactivos químicos.



Figura 7. Otros símbolos de riesgo empleados en laboratorios, plantas piloto e industrias.

Finalmente es importante también conocer o familiarizarse con el código de colores que se emplean de forma general en algunas normas tanto institucional como en el sector industrial.

1.5 Código de colores para tuberías de servicios en los laboratorios de docencia e investigación.

También es importante mencionar que en los laboratorios de nuestra universidad existe otro tipo de señalización por colores y ésta se refiere a las tuberías de la siguiente manera:

Color de la instalación	Significado
Amarillo	Gas
Azul	Agua
Blanco	Vacío
Café	Telefonía
Rojo	Eléctrico
Verde claro	Red de computo
Verde oscuro	Aire comprimido

Bibliografía

Harris, D.C. (2004). Análisis químico cuantitativo. 2a edición. Editorial Reverté, S.A. España. Cap. 20.

Munchausen, L.L., Corkern, W.H. (1991). The color of the safety. *J. Chem. Educ.* 68(4): 101 A.

Shugar, G.J., Ballinger, T. (1990). Chemical technicians' ready reference handbook. 3a edición. McGraw-Hill, INC. EUA. Caps 1 y 2.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2005). Fundamentos de química analítica. 8a edición. International Thomson Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 2.

Verde, C.J.R., Vega, A.E., López, C.J.I., Estrada, Z.M.E., Malpica, S.F.P., Martínez, O.F., Pelayo, Z.C., Pérez, C.M.C., Ruiz, S.P., Trejo, A.G.M. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de química analítica. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. pp 10-14.

Tema II

Matemáticas básicas en el laboratorio

2.1 Sistema internacional de unidades

El Sistema Internacional de Unidades (SI) rige como se deben expresar las unidades en el campo científico. Este sistema se compone de siete unidades básicas (Shugar & Ballinger, 1990) que se muestran en la Tabla 2.1. De ellas se derivan muchas otras unidades como el voltio, herzio, culombio y joule (Skoog y cols., 2005).

Tabla 2.1. Unidades básicas del Sistema Internacional

Cantidad física	Nombre de la unidad	Abreviatura
Masa	Kilogramo	Kg
Longitud	Metro	m
Tiempo	Segundo	S
Temperatura	Kelvin	K
Cantidad de una sustancia	Mol	mol
Corriente eléctrica	Amperio	A
Intensidad luminosa	Candela	Cd

Las unidades base no siempre se pueden usar debido al tamaño de la muestra medida y para adecuarlas a las necesidades reales se usan prefijos, múltiplos y submúltiplos de 10. Por ejemplo, el prefijo kilo significa mil veces (10^3) la unidad básica y se simboliza por k.

En química analítica es común determinar el volumen de líquidos y se miden con las unidades denominadas litro (L). El litro, es la unidad del volumen de SI, y se define como 10^{-3} m. El mililitro se define como 10^{-6} m o 1 cm^3 (Skoog y cols., 2005).

A continuación se muestran las abreviaturas que se emplean con más frecuencia en los cursos de química (Verde y cols., 2013).

Abreviaturas Más Usuales en Química

L	litro
mL	mililitro
μL	microlitro
Kg	kilogramo
g	gramo
mg	miligramo
μg	microgramo
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius
K	grados Kelvin
$^{\circ}\text{F}$	grado Fahrenheit
m/v	masa sobre volumen
% Alc. Vol.	por ciento de alcohol en volumen a 20°C
N	normalidad
M	molaridad
m	molalidad

2.2 Cifras Significativas

El número de cifras significativas en una medida en el laboratorio es el número de dígitos que se conocen con seguridad, más uno que es incierto o dudoso. Por ejemplo, la balanza analítica tiene la capacidad de medir 6 cifras (por ejemplo 13.5217 g) mientras que la balanza granataria reportará el mismo dato con sólo 4 cifras (13.52). En el caso de la masa obtenida con la balanza analítica se puede reportar como 13.5217 ± 0.0001 . La notación $\pm$ (se lee más o menos 0.0001) es la forma útil de expresar la incertidumbre de una medición (Vega & Konigsberg, 2001). El número de cifras significativas en una medida se cuenta comenzando con el dígito no cero y termina después de incluir el último número dudoso (Shugar & Ballinger, 1990). Los ceros no siempre son cifras significativas ya que se pueden usar para ubicar el punto decimal, o sea que 13.52 g se puede expresar de las siguientes formas:

$$13.52 \text{ g} = 0.01352 \text{ kg} = 13.52 \times 10^3 \text{ mg}$$

En cualquiera de las expresiones anteriores se tienen sólo 4 cifras significativas.

El número de cifras significativas en una cantidad medida se puede determinar empleando las siguientes reglas (Shugar & Ballinger, 1990):

1. El concepto de cifras significativas sólo se aplica a las cantidades medidas y a las cantidades obtenidas a partir de cálculos.
2. Todas las cifras significativas incluirán al final el primer dígito dudoso que no sea cero; 0.75 (dos cifras significativas).
3. Todas las cifras significativas incluirán al final al primer dígito dudoso encontrado, incluyendo al cero; 21.00 (4 cifras significativas).
4. La localización del punto decimal o unidades de medidas usadas no tendrán ningún efecto sobre el número de cifras significativas usadas; 0.0020 g (2 cifras significativas).
5. Los ceros finales de un dato entero no son significativos (500), si se desea expresar que son significativos, se convierte el dato añadiendo un punto (500.0) o se expresa en notación de mantisa y potencias de diez (5.00×10^2). Tres cifras significativas.
6. La respuesta en un problema de división o multiplicación se redondeará de tal manera que tenga el mismo número de cifras significativas que el número menor de cifras significativas utilizadas en la operación.
Ejemplo 1:
a) $(1.25 \text{ cm})(24.68 \text{ cm}) = 30.8 \text{ cm}^2$
b) $1.53 \text{ mmol} + 60.85 \text{ mL} = 0.025 \text{ M}$
7. En el caso de la respuesta en un problema de adición y sustracción, el último dígito que se retiene en la suma y la resta se determina por la posición del primer dígito dudoso.
Ejemplo 2:
a) $2587.45 \text{ g} + 5.8 \text{ g} = 2593.2$ (observe que aunque 5.8 sólo tiene dos cifras significativas, el resultado tiene cinco pero únicamente un dígito dudoso).
b) $8.70 \text{ g} - 3.9275 \text{ g} = 4.77$ (el resultado solo tiene un dígito dudoso).

Redondeo de las Cifras Significativas

Un aspecto importante al reportar el resultado de operaciones matemáticas con números obtenidos de mediciones es el **redondeo de cifras**, el cual debe hacerse para expresar dicho resultado correctamente. Las reglas de las cifras significativas muestran donde se debe redondear. Las convenciones para ello son:

8. Si el número que se va a eliminar es menor de 5, el número que le precede no cambia; 13.25 se redondea a 13.2.
9. Cuando la cifra que se va a eliminar es mayor a 5, el número que le precede se incrementa en 1; 21.76 se redondea a 21.8.
10. Si la cifra siguiente a la que se ha de redondear es exactamente 5, la cifra por redondear se aumenta en una unidad *si es impar*, o se deja como tal *si es par*. Por ejemplo, al redondear a 4 cifras significativas el número 7.01350 el resultado es 7.014, y al redondear a 2 cifras significativas el número 3.4500, el resultado es 3.4.
11. Asimismo, el número de cifras decimales en el resultado de operaciones de adición o sustracción está determinado por el sumando con el menor número de decimales.

Ejemplo 3:

$$0.43 \text{ g} + 132.1 \text{ g} - 18.46 \text{ g} + 0.0021 \text{ g} - 35.49 \text{ g} = 78.5821 \text{ g}$$

El valor debe redondearse a 78.6 g ya que el sumando 132.1 g es el que posee el menor número de decimales y el resultado debe tener, por tanto, un solo decimal (Verde y cols., 2013).

1.1 Resolución de Ecuaciones simultáneas con dos incógnitas

El sistema de ecuaciones simultáneas es un conjunto de dos o más ecuaciones que tienen idéntica resolución. Para encontrar el valor de dos incógnitas es necesario tener dos ecuaciones ya que el número de ecuaciones requeridas es igual número de incógnitas. Son cinco los métodos que se emplean para resolver este tipo de sistemas (Becerra, 2014) y en este manual no se incluirá la resolución por el método gráfico. Los cinco métodos son:

- a. método de suma y resta
- b. método de igualación
- c. método de sustitución
- d. método de determinantes
- e. método gráfico

2.3.1 Método de suma y resta

Este método se basa en la propiedad de las igualdades, lo que significa que las operaciones algebraicas se hacen en ambos lados de la ecuación a fin de conservar la igualdad. En primer lugar se multiplica una o las dos ecuaciones por aquella(s) cantidad(es) que al sumarse con la otra ecuación se elimine una de las dos incógnitas. Después se sustituye el dato de la primera incógnita en cualquiera de las dos ecuaciones originales y se despeja la segunda incógnita.

Ejemplo 4. Encuentre los valores de "x" y "y" para el siguiente sistema de ecuaciones:

$$x + y = 2.000 \quad (1)$$

$$1.5225x + 2.4276y = 4.000 \quad (2)$$

Solución: La ecuación 1 por (-1.5225) se tiene la ecuación 1.1

$$-1.5225x - 1.5225y = -3.045 \quad (1.1)$$

Las ecuaciones 2 y 1.1 se suman y de esta manera se elimina “x” y se obtiene la ecuación 3:

$$0.9051 y = 0.955 \quad (3)$$

El valor de “y” se obtiene al despejar esta incógnita de la ecuación 3.

$$y = \frac{0.955}{0.9051} = 1.05. \text{ El valor de “x” se obtiene al sustituir el valor obtenido de “y” en la ecuación 1 y se obtiene la ecuación 3.1}$$

$$x + 1.055 = 2.000 \quad (3.1)$$

El valor de “x” se obtiene al despejar dicha incógnita de la ecuación 3.1

$$x = 2.000 - 1.055 = 0.945.$$

2.3.2 Método de igualación

En este método se despeja una de las incógnitas en ambas ecuaciones. Dado que el valor que tiene la incógnita es el mismo en ambas ecuaciones por lo que se procede a igualar ambas ecuaciones y así se obtiene una sola ecuación. El valor de la incógnita se obtiene al despejar ésta de la ecuación.

Ejemplo 5. ¿Cuáles son los valores de “x” y “y” para el siguiente sistema de ecuaciones simultáneas?

$$x + y = 0.7100 \quad \text{ec (1)}$$

$$x + 0.6916y = 0.6318 \quad \text{ec (2)}$$

El valor de “x” se despeja de ambas ecuaciones y se obtiene:

$$x = 0.7100 - y \quad \text{ec (2.1)}$$

$$x = 0.6318 - 0.6916y \quad \text{ec (2.2)}$$

Se igualan las ecuaciones 2.1 y 2.2 y se obtiene la ecuación 3:

$$0.7100 - y = 0.6318 - 0.6916y \quad \text{ec (3)}$$

La ecuación 3 se reordena y se factoriza:

$$0.7100 - 0.6318 = y (1 - 0.6916) \quad \text{ec (3.1)}$$

El valor de “y” se obtiene al despejar ésta incógnita de la ecuación 3.1

$$y = \frac{(0.7100 - 0.6318)}{(1 - 0.6916)} = 0.2535 \quad \text{ec (3.2)}$$

El valor de “x” se obtiene al introducir el valor de “y” en la ecuación 2.1

$$x = 0.7100 - 0.2535 = 0.4565$$

2.3.3 Método de sustitución

En éste método se despeja “x” de la ecuación 1 y se sustituye en la ecuación 2, con lo que se logra obtener una ecuación con sólo una incógnita y resolviendo ésta ecuación se obtiene el valor de “y”. El valor de “x” se obtiene al sustituir el valor de “y” en la ecuación que tiene “x” despejada.

Ejemplo 6. Encuentre los valores de "x" y "y" en el siguiente sistema de ecuaciones

$$x + y = 0.6240 \quad \text{ec (1)}$$

$$0.7806x + 0.7506y = 0.4830 \quad \text{ec (2)}$$

La incógnita "x" se despeja de la ecuación 1

$$x = 0.6240 - y \quad \text{ec (1.1)}$$

El valor de "x" (ec 1.1) se sustituye en la ecuación 2

$$0.7806 (0.6240 - y) + 0.7506y = 0.4830 \quad \text{ec (2.1)}$$

$$0.4870 - 0.7806y + 0.7506y = 0.4830 \quad \text{ec (2.2)}$$

$$y (0.7506 - 0.7806) = 0.4830 - 0.4870 \quad \text{ec (2.3)}$$

El valor de "y" se obtiene al despejar ésta incógnita de la ecuación 2.3.

$$y = \frac{(0.4830 - 0.4870)}{(0.7506 - 0.7806)} = 0.1333 \quad \text{ec (2.4)}$$

El valor de "x" se obtiene al introducir el valor de "y" en la ecuación 1.1.

$$x = 0.6240 - 0.1333 = 0.4907 \quad \text{ec (2.4)}$$

2.3.4 Método de determinantes

Un determinante es la ordenación de números o cantidades, dispuestos en igual número de filas que de columnas. Su símbolo son dos líneas verticales que abarcan ambas cantidades. Un determinante de segundo orden es aquel que tiene dos filas y dos columnas y la ordenación cuadrangular de los 4 números y el desarrollo es de la siguiente manera:

$$\begin{vmatrix} a & b \\ c & d \end{vmatrix} = ad - cb$$

Se resuelve un sistema de ecuaciones simultáneas con dos incógnitas por determinantes siempre y cuando ambas ecuaciones estén ordenadas de la siguiente forma:

$$ax + by = c \quad \text{ec (1)}$$

$$dx + ey = f \quad \text{ec (2)}$$

Donde **a, b, c, d, e, y f** representan números:

Esto significa que en las columnas deben estar las mismas incógnitas y después del signo igual deben estar en columna todos los términos independientes, es decir los números que no tienen incógnita.

Para obtener el valor de cualquiera de las incógnitas se calcula el valor del denominador, al cual designaremos como delta "Δ", estará formado por los coeficientes de las incógnitas en el orden que están.

El numerador es el determinante por el coeficiente de las dos incógnitas en el orden que están, en el que se sustituye la columna de los coeficientes de la incógnita por la columna de los términos independientes. Al numerador se designará como Δx ó Δy.

Ejemplo 7. Encuentre los valores de «X» y «Y» en el siguiente sistema de ecuaciones.

$$16440 X + 3870 Y = 0.957 \quad \text{ec (1)}$$

$$3990 X + 6420 Y = 0.559 \quad \text{ec (2)}$$

$$\Delta = \begin{vmatrix} 16440 & 3870 \\ 3990 & 6420 \end{vmatrix} = (16440)(6420) - (3990)(3870) = 90103500$$

$$\Delta x = \begin{vmatrix} 0.957 & 3870 \\ 0.559 & 6420 \end{vmatrix} = (0.957)(6420) - (0.559)(3870) = 3980.610$$

$$x = \frac{\Delta x}{\Delta} = \frac{3980.610}{90103500} = 0.0000442 = 4.42 \times 10^{-5}$$

El valor de "y" se obtiene al sustituir el valor de "x" en cualquiera de las dos ecuaciones.

$$Y = [0.957 - (16440)(4.42 \times 10^{-5})]/3870 = 5.96 \times 10^{-5}.$$

En los libros de texto de química analítica y métodos instrumentales comúnmente resuelven este tipo de ecuaciones por el método de sustitución (Willard y cols., 1991., Skoog y cols., 2005) y determinantes (Harris, 2004).

Bibliografía

- Becerra, E. J.M. Matemáticas básicas. Facultad de Contaduría y Administración. UNAM. www.fca.unam.mx/docs/apuntes_matematicas/10.%020Ecuaciones.pdf. Consultada en Febrero de 2014.
- Harris, D.C. (2004). Análisis químico cuantitativo. 2ª edición. Editorial Reverté, S.A. España. Cap. 20.
- Shugar, G.L., Ballinger, J.T. (1990). Chemical technicians. Ready references handbook. 3ª Edición. Mc Graw-Hill, Inc. USA. Cap. 6.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2005). Fundamentos de química analítica. 8ª edición. International Thomson Editores, S.A. de C.V. México, D.F. Caps. 4 y 23.
- Vega, A.E., Konigsberg, F.M. (2001). La teoría y la práctica en el laboratorio de química general para ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. Cap. 3.
- Verde, C.J.R., Vega, A.V., López, C.J.I., Estrada, Z.M.E., Malpica, S.F.P., Martínez, O.F., Pelayo, Z.C., Pérez, C.M.C., Ruiz, S.P., Trejo, A.G.M. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de química analítica. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

Tema III

Estadística en el laboratorio

3.1 Introducción

La estadística es absolutamente necesaria en el laboratorio químico para determinar la calidad de los datos cuantitativos, ya que por lo general los datos que se obtienen, no están del todo libre de errores o de incertidumbres. Al combinarse dichas incertidumbres producen una dispersión de resultados. No obstante, es posible evaluar la magnitud del error de una determinada medición dentro de un cierto nivel de probabilidad si se definen los límites entre los cuales está el verdadero valor de una cantidad medida. Para ello habrá que estimar la exactitud y la precisión de los datos experimentales (Vega & Konigsberg, 2001).

3.2 Precisión y Exactitud

En ingeniería, ciencia, industria y estadística los términos exactitud y precisión no son sinónimos y por lo tanto, no son equivalentes. A continuación se definen ambos términos (Verde y cols., 2013).

Precisión

Se refiere a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud. Cuanto menor es la dispersión mayor la precisión. Una medida común de la dispersión o variabilidad de los datos es la desviación estándar, la cual se utiliza para describir la reproducibilidad de los resultados experimentales. Se puede definir como el nivel de similitud entre los valores numéricos de varias medidas de la misma propiedad, realizadas bajo las mismas condiciones experimentales.

Exactitud

Se refiere a que tan cerca del valor real se encuentra el valor medido. En términos estadísticos, la exactitud está relacionada con el sesgo de una estimación. Cuanto menor es el sesgo más exacto es la estimación. La Fig.8 ilustra ambos conceptos.

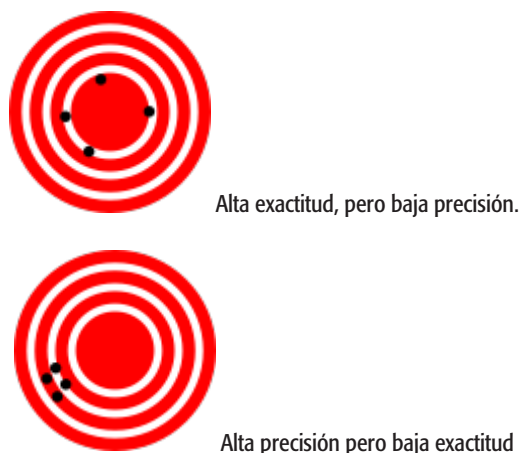


Figura 8. Tiro al blanco para ilustrar la diferencia entre exactitud y precisión.

En la Fig. 8 aparece el resultado de varios tiros con arco hacia un objetivo. La exactitud describe la proximidad de las flechas al centro del objetivo, las flechas que llegaron más cerca del centro se consideran más exactas. Cuanto más cerca están las medidas a un valor real o aceptado, más exacto es el sistema de medición.

La precisión, en este ejemplo, es la distancia entre los impactos de las flechas, es decir, que tan distantes quedaron unos de otros; cuanto más cercanos entre sí hayan quedado estos impactos, más precisos fueron los lanzamientos. Similarmente, entre más cercanos estén los resultados de varias mediciones efectuadas, más preciso será el sistema de medición. En sí, se puede decir que la precisión es el grado de repetitividad del resultado.

Hay que notar que el hecho de que las flechas estén muy cercanas entre sí es independiente al hecho que esté cerca del centro del objetivo. Resumiendo, se puede decir que exactitud es el grado de veracidad, mientras que precisión es el grado de reproducibilidad.

Ejemplo 1. Un reloj analógico, de manecillas, desplaza su minutero “sólo de minuto en minuto”, si bien lo hace en absoluta sincronía con el horario oficial o “real” (el objetivo en el tiro al blanco). Un segundo reloj utiliza minutero, segundero e incluso está dotado de un sistema de medición de décimas de segundo, sin embargo observamos que su horario no coincide plenamente con el horario oficial o real (que sigue siendo el objetivo). Por lo tanto, concluiremos que el primer reloj es altamente exacto, aunque no sea preciso, mientras que el segundo, es altamente preciso, aunque no se muestra exacto.

3.3 La Media Aritmética

En un experimento se obtiene un resultado, al realizar el mismo experimento en varias ocasiones se obtienen resultados con valores distintos, ¿qué valor se reportará como resultado del ensayo? El resultado numérico representativo de una serie de pruebas es la **media aritmética** de los resultados individuales, la cual se encuentra dividiendo la suma de los resultados entre el número de determinaciones en serie y se expresa matemáticamente (Miller & Miller, 1993) como sigue:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad \text{ec (3.1)}$$

Donde x_i se refiere a cada uno de los datos. El símbolo Σ significa suma. Por lo tanto $\sum_i x_i = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n$. El número n se relaciona con el número total de valores. A la media también se le conoce como promedio y es la suma de todos los valores dividida entre el número total de valores n .

Ejemplo 2. Los porcentajes de sobrevivencia celular obtenidos en una serie de experimentos fueron: 68.5; 66.65; 66.65; 64.15; 66.65; 60.65; 76.35. Calcule la media aritmética.

Solución:

$$\bar{x} = \frac{68.5 + 66.65 + 66.65 + 64.15 + 66.65 + 60.65 + 76.35}{7} = 67.10_0$$

Para evitar el redondeo de las medias y la desviación estándar, es común conservar una cifra significativa adicional a las que se encuentran en los datos iniciales (en este caso el cero escrito como subíndice es la cifra adicional).

3.4 Error Experimental

La exactitud de un resultado se expresa mediante el error experimental que es la diferencia entre el valor real o aceptado (medición correcta) y el obtenido experimentalmente. El *error* puede expresarse en *por ciento* de la medición correcta o también como un porcentaje de todo el rango de medición del instrumento utilizado.

$$E (\%) = \left(\frac{\text{valor obtenido} - \text{dato verdadero}}{\text{dato verdadero}} \right) \times 100 \quad \text{ec (3.2)}$$

Otra forma de expresar el error experimental es mediante el *error absoluto* que es la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero.

$$Ea = \text{Valor verdadero o correcto} - \text{Valor experimental} \quad \text{ec (3.3)}$$

3.5 Desviación estándar

La precisión de un resultado se puede expresar mediante la desviación estándar. La desviación estándar, s , expresa qué tanto se agrupan los datos alrededor de la media (Miller & Miller, 1993).

$$\text{Desviación estándar} = s = \sqrt{\sum_i (X_i - \bar{X})^2 / (n - 1)} \quad \text{ec (3.4)}$$

Ejemplo 3. Como parte de los trabajos sobre las diferencias en los valores publicados del peso atómico del galio, se ha medido la razón del número de átomos de los isótopos ^{69}Ga y ^{71}Ga en muestras de diferentes orígenes. Los resultados para 6 muestras fueron los siguientes:

Muestra	$^{69}\text{Ga}/^{71}\text{Ga}$	Muestra	$^{69}\text{Ga}/^{71}\text{Ga}$
1	1.52660	4	1.52894
2	1.52974	5	1.52804
3	1.52592	6	1.52685

- Encuentre la media de $^{69}\text{Ga}/^{71}\text{Ga}$
- Calcule la desviación estándar

Solución

- Media aritmética.

$$\bar{X} = \frac{1.52660 + 1.52974 + 1.52592 + 1.52894 + 1.52804 + 1.52685}{6}$$

$$\bar{X} = 1.52768_1$$

- Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{(1.52660-1.52768)^2 + (1.52974-1.52768)^2 + (1.52592-1.52768)^2 + (1.52894-1.52768)^2 + (1.52804-1.52768)^2 + (1.52685-1.52768)^2}{5}}$$

$$s = 0.00147_7$$

El promedio y la desviación estándar deben terminar en el mismo decimal (Vega & Königsberg, 2001). Para $\bar{X} = 1.52768$, el valor de $s = 0.00147$ es el correcto.

3.6 Mínimos cuadrados

Frecuentemente se busca trazar la “mejor” línea recta que pase a través de una serie de puntos experimentales. Una solución a este dilema es “a buen ojo” y con ayuda de una regla trazar la mejor línea que tenga en ella el mayor número de datos. Una mejor opción es el utilizar la estadística para definir la mejor línea recta. Una línea recta deberá relacionarse con la ecuación de la recta: $y = mx + b$, donde “y” representa la variable dependiente y “x” se refiere a la variable independiente, “m” la pendiente de la curva y “b” representa la ordenada al origen (eje de las y). Se ha determinado matemáticamente que la mejor línea recta que pasa a través de una serie de puntos es una línea en la cual la suma del cuadrado de las desviaciones de los datos es mínima, esto se conoce como el **método de los mínimos cuadrados**.

Cuando se usa el método de los mínimos cuadrados para generar una curva de calibración, se supone que los errores en los valores tomados como ordenadas (valores y) son mayores que los valores en los errores de las abscisas (valores x). Una segunda suposición es que las incertidumbres (desviaciones estándar) de todos los valores de las ordenadas son similares entre sí. En muchos casos si existe una relación lineal entre la cantidad en (x) y la respuesta en (y), o sea que la gráfica es una recta y se puede aplicar la función: $y = mx + b$, donde " m " es la pendiente y " b " es la *ordenada al origen*.

También se considera que los valores de x (podrían ser las concentraciones de los estándares) están libres de error. Se supone que los datos experimentales que no coincidan exactamente sobre la línea se deben por completo a errores indeterminados en las lecturas de instrumento y . La suma de los cuadrados de las desviaciones de las lecturas reales del instrumento y los valores correctos, son minimizados al ajustar los valores de la pendiente, " m ", y la ordenada al origen, " b ". Para encontrar los valores de m y de b que minimizan la suma de los cuadrados de las *desviaciones verticales* se emplean las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{\sum x_i y_i}{\sum x_i^2} \quad \text{ec (3.5)}$$

$$b = \frac{\sum x_i y_i}{\sum x_i^2} \quad \text{ec (3.6)}$$

n se relaciona con el número de puntos. El problema de saber cuántas cifras significativas se deben asociar con m y b se realizará después de calcular la incertidumbre en la pendiente y la ordenada al origen.

Para obtener las incertidumbres (expresadas como desviaciones estándar) en la pendiente y ordenada al origen, es necesario efectuar un análisis de incertidumbres con las ecuaciones 3.6 y 3.7. Para determinar la desviación estándar de las desviaciones verticales, se usa la ecuación:

$$s_y = s_y = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{n-2}} \quad \text{ec (3.7)}$$

$$\text{Donde; } d_i = y_i - y = y_i - (mx_i + b) \quad \text{ec (3.8)}$$

Para obtener la varianza (el cuadrado de la desviación estándar) de la pendiente y la varianza de la ordenada al origen se usan las ecuaciones:

$$s_m^2 = \frac{s_y^2}{D} \quad \text{ec (3.9)}$$

$$s_b^2 = \frac{s_y^2 \sum x_i^2}{D} \quad \text{ec (3.10)}$$

σ_m = Desviación estándar estimada para la pendiente.

σ_b = Desviación estándar estimada para el origen.

n = número de datos.

$$D = \sum (x_i^2) - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

Al combinar las ecuaciones 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9 podemos escribir las incertidumbres como una desviación estándar:

$$\text{pendiente} = m \pm \sigma_m$$

$$\text{Ordenada al origen} = b \pm \sigma_b$$

La elección de la *última cifra significativa de la pendiente y la ordenada al origen depende de la posición decimal del primer dígito de la desviación estándar*.

Ejemplo 4: Un procedimiento común para determinar proteínas es utilizar el método colorimétrico de Bradford. En este método, un colorante se une a la proteína y su color cambia de castaño a azul. La intensidad de color azul es proporcional a la cantidad de proteína presente. En la siguiente tabla se muestran datos que relacionan la absorbencia de la muestra con el contenido de proteína:

Concentración de proteína (μg)	0.00	9.36	18.72	28.08	37.44
Absorbencia a 595 nm	0.466	0.676	0.883	1.086	1.280

Por el método de mínimos cuadrados, determine la ecuación de la mejor recta que pase por estos puntos. Utilice la desviación estándar de la pendiente y la ordenada al origen para expresar la ecuación en la forma $y = [m \pm (\sigma_m)]x + [b \pm (\sigma_b)]$ con una cantidad razonable de cifras significativas.

- Represente gráficamente los datos experimentales y la recta definida en el inciso (a).
- Una muestra problema de proteína tuvo absorbencia de 0.973. Calcule la cantidad de proteína (en μg) presente en la muestra problema y estime la incertidumbre (expresándola como desviación estándar).

Solución:

- Construir una tabla que contenga los datos que se incluyen en las ecuaciones 3.5 y 3.6

x_i (μg de proteína)	y_i (Absorbencia)	$x_i y_i$	x_i^2
0.00	0.466	0.000	0.00
9.36	0.676	6.327	87.610
18.72	0.883	16.530	360.438
28.08	1.086	30.495	788.486
37.44	1.280	47.923	1401.754
$\sum x_i = 93.60$	$\sum y_i = 4.391$	$\sum x_i y_i = 101.275$	$\sum x_i^2 = 2628.288$

- Aplicar la ecuación 3.5 para obtener el valor de la pendiente.

$$m = \frac{\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} = \frac{101.275 - \frac{(93.60)(4.391)}{5}}{2628.288 - \frac{(93.60)^2}{5}} = \frac{95.377}{4380.48} = 0.021773$$

$$m = 0.021773 \mu\text{g}^{-1}$$

- a. El término $\sum (x_i^2)n$ lo podemos denominar D, a fin de facilitar las operaciones aritméticas ya que este se incluye en los divisores de las ecuaciones necesarias para obtener la ordenada al origen (b), en el cuadrado de la desviación estándar de la pendiente (σ_m^2) y en el cuadrado de la desviación estándar de la ordenada al origen (σ_b^2).

$$D = 4380.48$$

- a.2) Obtener el valor de la ordenada al origen.

$$b = \frac{\sum x_i y_i}{\sum x_i^2} = \frac{2061.473}{4380.48}$$

$$b = 0.4706$$

La ecuación de la mejor línea recta que pasa por los puntos es:

$$y = 0.021773x + 0.4706$$

- a.3) Para obtener la desviación estándar de las desviaciones verticales, construir una tabla con los datos necesarios, e introducir los valores de $m = 0.021773$ y $b = 0.4706$.

x_i	Y_i	mx_i	$d_i = y_i - mx_i - b$	d_i^2
0.00	0.466	0.000000	-0.004600	2.12×10^{-5}
9.36	0.676	0.203796	0.001604	2.58×10^{-6}
18.72	0.883	0.407591	0.004809	2.31×10^{-5}
28.08	1.086	0.611386	0.004014	1.61×10^{-5}
37.44	1.280	0.815181	-0.005781	3.34×10^{-5}
				$\sum d_i^2 = 9.64 \times 10^{-5}$

- a.3.1) Obtener las desviaciones estándar de las desviaciones verticales.

$$s_y = s_y = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{9.64 \times 10^{-5}}{3}} = 0.00567$$

- a.3.2) Obtener la desviación estándar de la pendiente.

$$s_m^2 = \frac{s_y^2 n}{D} = \frac{(0.00567)^2 \times 5}{4380.48} = 3.6696 \times 10^{-8}$$

$$\sigma_m = 1.92 \times 10^{-4}$$

a.4) Obtener la desviación estándar de la ordenada al origen, σ_b .

$$s_b^2 = \frac{s_y^2 \sum x^2}{D}$$

$$\sigma_b^2 = \frac{0.00567^2 \cdot 628.288}{4380.48} = 1.929 \times 10^{-5}$$

$$\sigma_b = 0.0044$$

Combinando los resultados anteriores podemos escribir lo siguiente: (recuerde que la elección de la última cifra significativa de la pendiente y la ordenada al origen depende de la posición decimal del primer dígito de la desviación estándar).

pendiente = m = 0.021773

desviación estándar σ_m = 0.000192

m = 0.0218 ± 0.0002

Ordenada al origen = b = 0.47060

desviación estándar σ = 0.0044

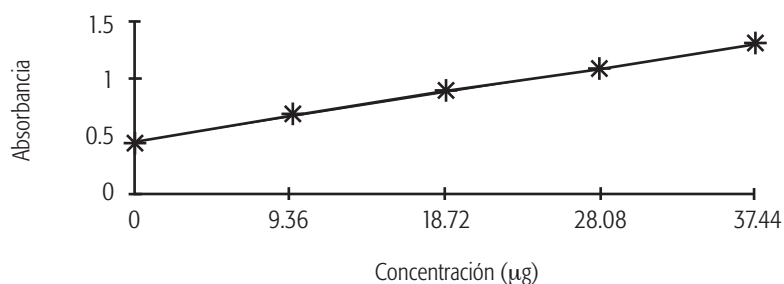
b = 0.471 ± 0.004

Así que la ecuación se puede expresar como:

$$y = [(0.0218 \pm 0.0002)]x + [0.471 \pm 0.004]$$

b)

Representación gráfica de los datos
experimentales y la recta definida en el inicio
a)



a. Los datos con que contamos para obtener la cantidad de proteína (x) presente en la muestra y la incertidumbre en el resultado son:

Absorbancia (y)	M	B	σ_y	σ_m	σ_b
0.973	0.0218	0.471	0.005 ₇	0.0001 ₉	0.004 ₄

Despejando x de la ecuación de la recta, tenemos que:

$$x = \frac{y}{m} \quad x = \frac{0.973}{0.0218}$$

c.1) Evaluar la diferencia colocada entre paréntesis, utilizando incertidumbres absolutas.

$$0.973 - 0.471 = 0.502$$

La incertidumbre en el resultado se obtiene a partir de las incertidumbres absolutas, de la siguiente forma:

$$x = \sqrt{(0.0057)^2 + (0.0044)^2} = 0.0072$$

$$\text{Así que: } 0.973 - 0.471 = 0.502 \pm 0.0072$$

c.2) Convertir las incertidumbres absolutas en incertidumbres relativas:

$$\% \text{ incertidumbre relativa} = (\text{incertidumbre absoluta} / \text{valor medido}) \times 100$$

Puesto que:

$$\% \text{ incertidumbre relativa en el dividendo} = \frac{0.0072}{0.502} \times 100 = 1.43$$

$$\% \text{ incertidumbre relativa en el divisor} = \frac{0.00019}{0.0218} \times 100 = 0.87$$

$$x = \frac{0.502(\pm 1.43\%)}{0.0218(\pm 0.87\%)} = 23.0_{27} \pm ?$$

$$? = \sqrt{(1.43)^2 + (0.87)^2} = 1.67$$

Y el valor de $x = 23.0_3 \pm 1.67 \%$

$$\text{La incertidumbre absoluta en el resultado es: } 23.0_3 \times \frac{1.67}{100} = 0.38$$

El resultado con el número de cifras significativas adecuadas es: $x = 23.0 \pm 0.4 \mu\text{g}$

Existen en el comercio muchas calculadoras o programas para calculadoras que realizan en forma automática el ajuste de curvas por mínimos cuadrados. Recuerde que si no se grafican previamente los datos, no se tiene la oportunidad de excluir los que son claramente defectuosos.

Bibliografía

Miller, J.C. y Miller, J.N. (1993). Estadística para química analítica. 2ª edición. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. U.S.A. Cap. 2.

Vega, A.E., Konisberg, F.M. (2001). La teoría y la práctica en el laboratorio de química general para ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. Cap. 4.

Verde, C.J.R., Vega, A.E., López, C.J.I., Estrada, Z.M.E., Malpica, S.F.P., Martínez, O.F., Pelayo, Z.C., Pérez, C.M.C., Ruiz, S.P., Trejo, A.G.M. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de química analítica. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. pp 16-17.

Tema IV

Fundamentos de Cromatografía.

Práctica 1. Separación de Colorantes por Cromatografía de Placa Fina y Columna

Objetivo

El alumno se relacionará con los fundamentos y conceptos básicos de la cromatografía, en este caso desarrollará una cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) y planteará las condiciones para separar por cromatografía en columna (CC) la misma muestra.

Introducción

La cromatografía es un conjunto de métodos de separación, purificación e identificación de compuestos que se basa en la interacción de los componentes de la mezcla con dos fases inmiscibles entre sí, una móvil y otra estacionaria. Las interacciones son del tipo de fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, transferencia de carga y arreglo de los enlaces tales como la estructura de los isómeros o quiralidad (Rubinson & Rubinson, 2000).

Los componentes de la mezcla son retenidos por la fase estacionaria y arrastrados por la fase móvil. La fase estacionaria, como su nombre lo indica, no se mueve y puede ser un sólido o bien un líquido soportado; en cambio la fase móvil puede ser un líquido o un gas (Skoog y cols., 2008).

Entre más fuerte es la interacción con la fase móvil, el compuesto recorrerá mayor distancia o avanzará más rápido durante la cromatografía y no lo hará si la interacción más fuerte es con la fase estacionaria. Esta diferencia de interacciones es la responsable de la separación de los compuestos de la mezcla (García-Segura y cols., 2008).

La cromatografía requiere cantidades muy pequeñas de los compuestos a analizar y tiene diferentes aplicaciones, entre ellas separar los componentes de una mezcla y en algunos casos cuantificar su concentración relativa; purificar un compuesto, separándolo de sus contaminantes o bien identificar un compuesto comparando su corrimiento con un estándar o comparando su R_f (Day & Underwood, 1989) o su tiempo de retención (Skoog y cols., 2008).

Para la cromatografía en capa fina y papel se emplea R_f , que es la relación que existe entre la distancia recorrida de un compuesto (medida en cm desde donde se colocó la muestra, origen, hasta el centro de la mancha) y la distancia recorrida con el disolvente también tomada desde el origen (Day & Underwood, 1989). Para la cromatografía en columna se emplea otro tipo de parámetro que es el tiempo de retención, es decir el tiempo que permanece el compuesto dentro de la columna (Skoog y cols., 2008).

La cromatografía en placa fina (o TLC, por sus siglas en inglés), es una cromatografía plana en la cual la fase estacionaria se encuentra adherida a un soporte que puede ser una placa delgada de vidrio, aluminio o plástico, pueden ser preparadas en el laboratorio o bien compradas a alguna casa comercial, siendo la sílica gel, alúmina o celulosa las más utilizadas. La fase móvil puede ser un disolvente o una mezcla de disolventes y se mantiene su composición durante toda la cromatografía. Esta fase móvil asciende por capilaridad a lo largo de la fase estacionaria (Day & Underwood, 1989).

A continuación se ejemplifica cómo medir el R_f para una mezcla, figura 9.

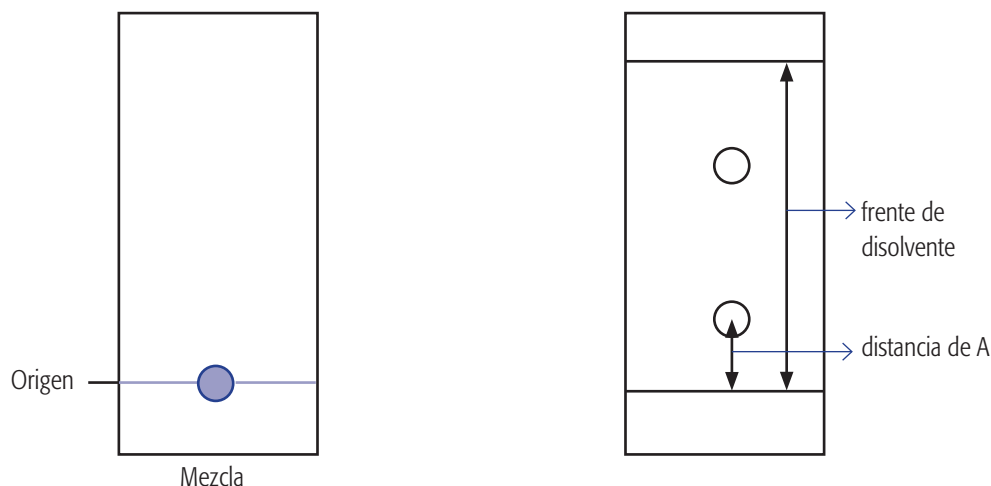


Figura 9. Datos empleados para la obtención del R_f .

El R_f del compuesto A, se calcula por la siguiente fórmula:

$$R_f_A = \frac{\text{Distancia de A en cm}}{\text{Frente del disolvente en cm}}$$

De donde podemos ver que $0 \leq R_f \leq 1$.

En la cromatografía en columna o CC la fase estacionaria está contenida en una columna. El tamaño y grosor de la columna varía, y esto depende del tipo y tamaño de la muestra a separar, por lo que se puede emplear desde una pipeta Pasteur hasta columnas de 1.0 m de altura y 15 cm de diámetro.

La fase móvil debe disolver a la mezcla de manera que la pueda “acarrear” a lo largo de la fase estacionaria. Y se adiciona desde la parte de arriba de la columna y se recoge en la parte baja de ella, puede llevar una llave para controlar el flujo de la fase móvil o ser continua. Es muy importante que la fase móvil siempre esté por encima de la fase estacionaria, pues si se llega a secar la fase estacionaria, podría cuartearse haciendo imposible continuar con la separación (Day & Underwood, 1989).

Dentro de las ventajas de la CC sobre la TLC están el que la composición de la fase móvil se puede variar durante la cromatografía y el que se puede separar una mayor cantidad de muestra.

La fase estacionaria que se empleará en esta práctica es el gel de sílice, y en este caso la interacción se establece entre los grupos Si-OH y Si-O-Si y los grupos funcionales de los compuestos orgánicos. Con respecto a los eluyentes empleados, éstos deben ser menos polares que la fase estacionaria, de forma tal que los compuestos menos polares sean los que se desplazan con mayor velocidad.

La polaridad de un compuesto está dada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes y una clasificación de la polaridad de los solutos se muestra en la Tabla 1. (Harris, 2004).

¿Y qué es la polaridad? En este caso se refiere a la polaridad de las moléculas. El momento dipolar (μ) molecular es un indicador de la polaridad general de una molécula. Su valor depende de la forma en que se enlazan los átomos así como la distribución de los enlaces (geometría molecular). Por ejemplo, en la molécula CCl_4 , tiene cuatro enlaces C-Cl de tipo polar (μ del enlace C-Cl = 1.56D). Sin embargo estos enlaces están distribuidos de forma simétrica por lo que se cancelan los momentos dipolares de los enlaces individuales y el momento dipolar resultante de la molécula es cero ($\mu = 0$), y como consecuencia el CCl_4 es un compuesto no polar que no se mezcla con el agua. La polaridad molecular general es el resultado de sumar las polaridades de los enlaces individuales, mas la contribución del par de electrones sin compartir de la molécula (McMurray, 2001).

Tabla 1. Polaridad de solutos

No polar	Polaridad intermedia débil	Polaridad intermedia fuerte	Polaridad fuerte
Hidrocaburos saturados	Éteres	Alcoholes	Polihidroxialcoholes
Hidrocaburos olefinicos	Cetonas	Ácidos carboxílicos	Aminoalcoholes
Hidrocaburos aromáticos	Aldehídos	Fenoles	Hidroxiácidos
Haluros de alquilo	Aminas terciarias	Aminas primarias y secundarias	Ácidos polipróticos
Mercaptanos	Compuestos nitro, sin átomos de H α	Oximas	Polifenoles
Sulfuros	Nitritos, sin átomos α	Compuestos nitro, con átomos de H α	
CS ₂		Nitrilos, con átomos de H α	

Tomado de Harris (2004).

Material	Reactivos
3 Placas para cromatografía de 3.0 cm de ancho X 8.0 cm de alto.	Etanol al 96%
1 Vaso de Koplin	Acetona
3 Pipetas graduadas de 5 mL	Disolución de anaranjado de metilo al 1.0 %
2 Capilares de vidrio	Disolución de azul de metileno al 1.0 %
1 Mechero	Disolución de rojo neutro al 1.0 %
4 Vasos de precipitado de 50 mL	Sílica gel
1 Matraces volumétricos de 10 mL	Sulfato de sodio anhidro
1 Píseta con agua destilada	
1 Pedazo de manguera	
1 Columna para cromatografía	
1 Soporte universal	
1 Agitador de vidrio	
1 Pinzas para bureta	
10 Tubos de ensaye	
1 Pinzas Mohr	
1 Gradilla para tubos de ensaye	
1 Pedazo de algodón	

Parte experimental

Cromatografía en capa fina

En esta parte el alumno determinará cuál es el mejor sistema de disolventes para la separación de una mezcla de colorantes.

1. Active las placas en la estufa a 110 °C por 30 minutos.
2. Marque muy finamente una raya a 0.5 cm, del inicio de la placa, con un lápiz teniendo cuidado de no rayar la fase estacionaria (sílica gel).

- Con la ayuda de los capilares aplique las muestras en cada placa según se muestra en el siguiente diagrama. Deje 0.5 cm de separación entre una mancha y la siguiente. Figura. 10.

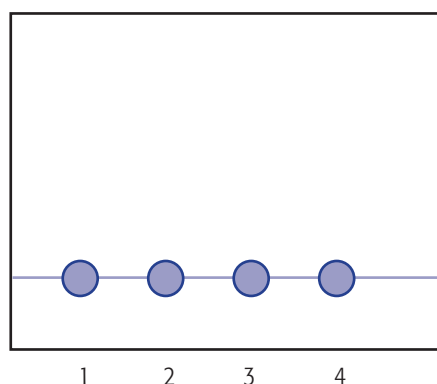


Figura 10. Colocación de las muestras en la placa de cromatografía

En el punto 1, coloque el anaranjado de metilo.

En el punto 2, aplique la mezcla de los tres colorantes.

En el punto 3, coloque el azul de metileno.

En el punto 4, aplique el rojo neutro.

- Recuerde aplicar la muestra tres veces en cada punto, deje secar la muestra entre una aplicación y otra.
- Introduzca cada placa en el vaso de Koplín que contenga cada una de las mezclas de los disolventes. La primera placa se desarrolla en etanol. La segunda en una mezcla etanol- acetona (2:1), y la tercera en una mezcla etanol-acetona (1: 2).
- Saque las placas cuando el frente del disolvente este a 0.5 cm, del final, de la placa. Secar las placas a la temperatura del laboratorio y observe con cual fase móvil se obtiene una mejor separación.

Cromatografía en columna

Una vez establecida la fase móvil óptima, se procede a realizar la cromatografía en columna utilizando el disolvente o la mezcla de disolventes elegidos previamente.

Método

- En la parte final de la columna se coloca un poco de algodón empapado en etanol para evitar que se salga la fase estacionaria y adicione 10 mL de la mezcla de disolventes elegida como fase móvil.
- Coloque en un vaso de precipitado de 100 mL, 20 g de sílica gel y 50 mL del disolvente que empleará como fase móvil.
- Agite la suspensión con la varilla de vidrio para sacarle el aire y comience a agregar dicha mezcla a la columna. Dar pequeños golpes en la columna para que se empaque homogéneamente la misma. Tenga cuidado de que siempre se encuentre el disolvente por encima de la sílica gel, para evitar cuarteaduras.
- Cuando se tengan unos 15 cm de columna empacada, deje que el disolvente baje hasta casi quedar tocando la superficie de la fase estacionaria.
- Adicione sulfato de sodio anhidro suavemente dentro de la columna, aproximadamente 1 cm (este quedara como capa superior de la columna para absorber toda la humedad de los eluyentes y muestra a purificar).

6. Aplique la mezcla de los tres indicadores previamente utilizados en la TLC.
7. Agregue la fase móvil seleccionada y tenga cuidado de que no se seque la columna.
8. Colecte en los tubos de ensaye las fracciones a la salida de la columna, sepárelas por color.

Informe de la práctica

Cromatografía en capa fina.

1. Dibuje un esquema de cada una de placas, indicando los puntos de aplicación y movimiento de los indicadores así como el frente del disolvente.
2. Calcule el R_f para cada indicador en cada fase móvil (un total de 9).
3. Identifique en cada placa, cada uno de los indicadores en la mezcla y analice qué tan buena fue la separación.
4. Con base a análisis del punto anterior, decir cuál es la fase móvil adecuada para la separación en columna.

Cromatografía en columna

1. Reporte como se observó la separación en la columna
2. ¿Cuántas fracciones se lograron separar? ¿Qué color tenía cada una de ellas?
3. ¿Qué color tenía la fracción que salió primero? ¿Cuál es la fracción más polar?

Cuestionario

1. Mencione 3 diferencias entre CC y la TLC.
2. ¿Cuál es la estructura química de cada uno de los colorantes? Con base a dichas estructuras, justifique el orden de retención en la columna.
3. ¿Cómo se verá una cromatografía en columna y en capa fina, si dos de los compuestos a separar tuvieran valores de R_f parecidos.
4. Si no se contara con un lápiz, ¿se podría marcar la línea del origen con pluma? Explique su respuesta.

Bibliografía

- Day, R.A., Underwood, A.L. (1989). Química analítica cuantitativa. 5ª Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. de C.V. México. Cap. 18.
- García-Segura, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez del Pozo, A., Montero, A., Oñaderra, M., Vivanco, F. (2008). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. 4ª reimpresión. Editorial Síntesis, S.A. España. Cap. 6.
- Harris, D.C. (2004). Análisis químico cuantitativo. 2ª edición. Editorial Reverté, S.A. España. Cap. 24.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ª edición. Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 26.
- Rubinson, J., Robinson, K. (2000). Química analítica contemporánea. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México. Cap. 13.
- McMurray, J. (2001). Química orgánica. International Thomson Editores. México. Cap 2.

Tema V

Cromatografía de gases

Práctica 2. Determinación de etanol en tequila/bebida alcohólica destilada, empleando el método de estándar externo.

Objetivo

Que el alumno conozca y maneje el cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica y aplique el método del estándar externo.

Introducción

La cromatografía de gases es la técnica más utilizada entre los métodos instrumentales de análisis ya que separa de manera rápida y sencilla una mezcla en sus componentes, el único requisito para su implementación es que las sustancias a separar sean estables a la temperatura necesaria para mantenerlas en estado gaseoso (Hernández & González, 2002).

Los componentes importantes del cromatógrafo de gases son:

- a. Columna. Pueden ser empacadas o capilares, en las primeras el soporte se encuentra empacado en tubos de acero inoxidable o vidrio que comúnmente tienen un diámetro de 3 a 6 mm y de uno a cinco metros de longitud. En las columnas capilares la longitud es mucho mayor, pudiendo llegar hasta 100 metros y con un diámetro entre 0.1 a 0.3 mm.
- b. Horno, es el encargado de mantener la temperatura de la columna. La temperatura elegida deberá estar en función de los compuestos que se deseen separar y deberá ser cuando menos el del punto de ebullición del componente menos volátil.
- c. Los gases empleados con mayor frecuencia son: nitrógeno, helio, hidrógeno y argón. La velocidad de flujo del gas acarreador, varía según el análisis y el tipo de columna, para columnas empacadas se recomiendan flujos entre 40-100 mL/min, que deberán regularse con una precisión mayor de 1 mL/min, y las capilares requieren flujos de 1 a 3 mL dependiendo del diámetro interno y la longitud de la columna.
- d. Detector de conductividad térmica. Su funcionamiento se basa en la capacidad de enfriamiento y en la facilidad que tiene para transferir el calor que absorbe, cualidad representada por su valor de conductividad térmica. Entre más grande sea el valor, la capacidad para transmitir el calor será mejor (Verde y cols., 1999).

En el análisis cuantitativo se pueden utilizar cuatro métodos:

1. Normalización
2. Calibración absoluta
3. Estándar externo
4. Estándar interno

Método de Estándar Externo

Este método tiene la característica de poder utilizar el mismo compuesto que se quiere cuantificar como estándar y consiste en inyectar en el cromatógrafo volúmenes constantes de disoluciones de concentraciones conocidas del compuesto que se desea cuantificar. Con los datos de las áreas o alturas de los picos (si estas casi no tienen base) se puede construir una gráfica de área

o altura vs concentración del analito, debiéndose obtener una línea recta. A partir de ella es posible realizar la cuantificación en una muestra desconocida por interpolación gráfica o matemática del pico obtenido en la recta (Figura 11).

El principal problema que plantea este método es la reproducibilidad de la inyección, o bien el control estricto de las cantidades inyectadas, aunque tomando las debidas precauciones la exactitud alcanzable es notable.

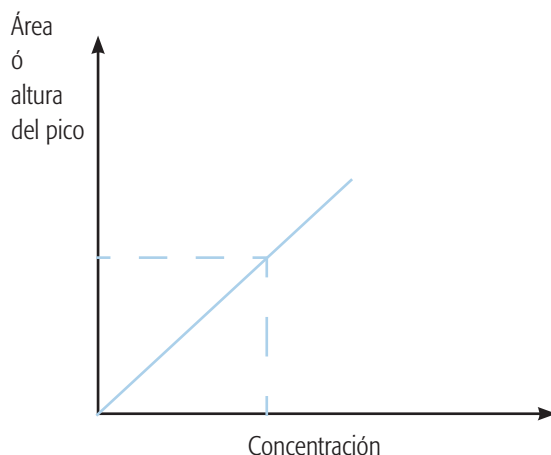


Figura 11. Curva para estándares externos

Materiales	Reactivos
Cromatógrafo de gases Gow Mac -350	Muestra de Tequila o bebida alcohólica destilada
Columna empacada con Carbowax 20 M de 1.2 m	Alcohol etílico
Medidor de Flujo de Burbuja	
Cronómetro	
Jeringa para cromatografía de gases de 50 µL	
5 Tubos de ensayo de 10x50 mm con tapón de baquelita	
5 Vasos de precipitado de 50 mL	
5 Pipetas volumétricas de 1 mL	
1 Propipeta	

Las instrucciones para el manejo del Cromatógrafo de Gases Gow-Mac, modelo 350 (Figura 12), están en la parte experimental.

Parte experimental

Preparación de soluciones:

1. De una muestra comercial de tequila, filtre 15 mL de la muestra. Guárdelos en recipientes cerrados.

2. Preparar 50 mL de soluciones estándar al 20, 30, 40 y 50% (v/v) de alcohol etílico.
3. Se inyectan 2 μL por separado tanto la muestra problema como cada una de las soluciones estándar.

Las condiciones del cromatógrafo son:

Tabla No. 1 Condiciones experimentales del cromatógrafo de gases:

Temperatura de columna	130 °C
Flujo de Gas	80 mL/min
Corriente del detector	200 mA (si el gas es helio) 100 mA (si el gas es nitrógeno)

Procedimiento de encendido del cromatógrafo Gow-Mac 350.

1. Tome en cuenta que el equipo requiere al menos de dos horas de calentamiento previo para estabilizar la línea base
 - 1.1 Abrir el gas helio.
 - 1.2 Encender el cromatógrafo (power). Figura 12.
 - 1.3 Las perillas controlan el porcentaje de corriente que pasa a través de ellas, gírelas hasta 40 del lado izquierdo del panel se encuentran como detector, inyector, detector y columna.
 - 1.4 Después de 1 h, encender el detector para dar tiempo a que la corriente se estabilice, reflejándose en una línea base horizontal.



Figura 12. Cromatógrafo de gases Gow Mac

2. Verifique el flujo del gas en la columna a utilizar con el medidor de flujo de burbuja.

Adquisición de datos cromatográficos

1. Encienda la computadora.
2. Se da click en el icono "clarity".
3. Se da click en login 350 TCD
4. En la siguiente ventana que se abre se da click en "OK" (sin cambiar ninguna información).
5. Aparece el diagrama de operación del equipo, al posicionarse en la imagen del cromatógrafo la figura se divide en cuatro imágenes, hacer clic en la imagen de la columna.
6. En la nueva pantalla, en donde dice "Method Setup" se escribe el nombre del método, abajo aparecen los datos sobre el tipo de columna, fase móvil, el flujo, la presión, el detector y la temperatura de trabajo (los cuales ya están predeterminados para los propósitos de esta práctica, no se deben modificar). Se da click en OK.
7. Se da click en el dibujo de la jeringa, en donde se escribe la identificación (ID) de la muestra y su nombre, posteriormente se da click en OK.

Desarrollo de la práctica

1. Con una microjeringa, inyectar 2 μ L de la muestra y de las soluciones estándar presione el botón que está en el extremo del cable controlador de la captura datos, figura 13. En pantalla se puede observar el desarrollo de la corrida cromatográfica, al terminar se oprime el mismo botón para indicar que detenga la colecta de datos.
2. Repetir el punto 12 con cada una de las soluciones estándar. (Se recomienda realizar por triplicado la inyección de la muestra y las soluciones estándar).
3. Se da click en donde dice "data acquisition" (adquisición de los datos).
4. Y aparece la siguiente pantalla, en donde se observa el movimiento de la línea base y la consecuente aparición de los picos experimentales.
5. Al terminar de salir los picos se vuelve a apretar el botón del extremo del cable para que el programa deje de tomar datos y se genera el reporte correspondiente con las tablas de áreas, los tiempos de retención, etc.
6. Para imprimir el cromatograma se da un click en "File", selecciónelo y posteriormente elija "Print".
7. Para apagar el equipo se coloca en "off" el detector, y se giran las perillas de los controles de temperatura de la columna, inyector y detector hasta que se apaguen los focos indicadores por último dejar enfriar la columna (aproximadamente 40 min) y una vez que baje la temperatura oprimir el botón de encendido/apagado general (power) en posición "off".
8. Se cierra la llave del gas.



Figura 13. Cable controlador

Reporte

1. Con la ayuda de los tiempos de retención del estándar de etanol, identifíquelo en el cromatograma de la muestra problema.
2. Calcule el porcentaje del alcohol etílico, utilizando el método de estándar externo.
 - a. Construya una gráfica de área vs. concentración de alcohol.
 - b. Para conocer la concentración del alcohol en la muestra problema obtenga la ecuación de la recta y recuerde que sólo se pueden hacer interpolaciones en este tipo de curvas patrones.

Cuestionario

1. ¿Cuál es el fundamento del detector de conductividad térmica?
2. Mencione los diferentes tipos de columna y explíquelos brevemente.
3. ¿Cuál es el (los) criterios para la elección del gas acarreador?
4. En un cromatógrafo Gow Mac 510 con detector de ionización de flama (FID), se corre una muestra de tequila, en una columna de Carbowax 20 M, se hacen dos análisis en la primera se inyectan los estándares de los compuestos de interés y en la segunda la muestra problema.
Los resultados se muestran en la tabla 2.
Tabla 2. Resultados cromatográficas de una muestra de tequila.

Compuesto	Concentración del estándar g/L	Área del estándar	Área del problema
Metanol	0.5	12356	10587
Etanol	38.5	45219	44251
Alcohol isoamílico	1.1	15483	11254

- Calcule, con base en el área el % de la muestra problema.
- Calcule, el % p/v de la muestra problema.
- Discuta, ¿cuál de los dos cálculos es más confiable y por qué?

Bibliografía

Hernández, H.L., González P.C. (2002). Introducción al análisis instrumental. Ariel, S.A. Barcelona.

Principios de cromatografía. (s.f). Recuperado el 15 de mayo de 2013 de www.mncn.csic.es/docs/repositorio//es.../principios_de_cromatografia.pdf.

Verde, C.J.R., Escamilla, H.M.L., Reyes, D.A., Malpica, S.F. (1999). Manual de prácticas de química analítica II. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. Cap. 1.

Tema VI

Cromatografía de HPLC

Práctica No. 3. Determinación de ácido gálico empleando el método de estándar interno

Objetivo

Que el alumno conozca y maneje el cromatógrafo de líquidos de alta resolución high performance liquid chromatography (HPLC) y aplique el método del estándar interno.

Introducción

El cromatógrafo de alta resolución consta de cuatro módulos: el sistema de bombas encargado de mantener constante el flujo de la fase móvil; el sistema de inyección que permite introducir la muestra a trabajar; la columna que tiene la función de separar los componentes de la muestra y el sistema de detección de los solutos eluidos, el cual manda una señal al sistema de registro (Verde y cols.,1999).

El Método de Estándar Interno está diseñado para compensar posibles errores derivados de la manipulación de la muestra. Este método consiste en añadir una cantidad conocida de un compuesto patrón a la muestra a analizar teniendo que hacerlo con ciertos cuidados experimentales como son: la pureza del estándar, el uso de material volumétrico, la selección adecuada del solvente tomando en cuenta la solubilidad del estándar y teniendo la precaución de filtrarlos con membranas de nylon o teflón de 0.45 μm antes de inyectarlos en el cromatógrafo (Verde y cols., 1999).

En el cromatograma aparecerán los picos correspondientes a los componentes de la muestra y el del compuesto patrón. Para aplicar el método se prepara una mezcla de concentraciones conocidas del estándar y de la muestra problema, después se obtiene el cromatograma para obtener las áreas correspondiente y poder calcular el factor de respuesta con la fórmula propuesta (Hernández & González, 2002).

El factor de respuesta está definido por la relación:

$$\frac{S}{P} = F \frac{A_s}{A_p}$$

Donde

[S] = concentración de soluto (m/v)

[P] = concentración de patrón (m/v)

A_s = Área del soluto

A_p = Área del patrón

Posteriormente en una segunda corrida cromatográfica se inyecta la mezcla del estándar interno de concentración conocida con una muestra problema. Y utilizando la misma fórmula se calcula ahora la concentración de la muestra problema.

Para el Método de Estándar Interno el estándar debe cumplir los siguientes requisitos:

- El pico del patrón debe dar un pico bien resuelto.
- El pico del patrón debe estar situado en cuanto a tiempo de retención, en las proximidades de los picos de interés.
- Durante el proceso de análisis debe tener un comportamiento similar al de los compuestos a cuantificar.

d) En ningún caso deberá estar presente en la muestra a analizar.

e) Debe ser químicamente estable.

Materiales		Reactivos
1	Cromatógrafo HPLC	Ácido gálico
	Columna Spherisorb ODS C ₁₈ 250 mm × 4.6 mm de diámetro	Ácido p-hidroxibenzoico
1	Jeringa para cromatografía de líquidos de 50 µL	Metanol grado HPLC
5	Tubos de ensayo de 10x50 mm con tapón de baquelita	Ácido acético grado HPLC
5	Vasos de precipitado de 50 mL	Agua destilada grado HPLC
2	Pipetas volumétricas de 1 mL	
1	Propipeta	

Parte Experimental

1. Las condiciones del cromatógrafo son:

Dimensiones de columna	Columna Spherisorb ODS C ₁₈ 250 mm x 4.6 mm de diámetro
Presión máxima	3500 psi
Fase Móvil	Metanol-ác. acético-agua (50:2:48)
Flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	20 µL

Preparación de soluciones:

Soluciones estándar

Preparar 10 mL de ácido gálico de concentración 10 ppm.

Preparar 10 mL de ácido p-hidroxibenzoico de concentración 10 ppm.

Mezclar 1 mL de cada una de las soluciones e inyectar 20 µL en el cromatógrafo.

Solución problema

Mezclar 1 mL de ácido gálico con 0.5 mL del estándar interno ácido p-hidroxibenzoico. Inyectar 20 µL en el cromatógrafo.

Realizar cada determinación por triplicado.

Procedimiento de encendido para el cromatógrafo de líquidos.

1. Encienda los módulos de la bomba binaria (Fig.14) y del detector (Fig.15).



Figura 14. Módulo de bomba binaria, para separaciones isocráticas.

2. Suba el flujo de 0.1 mL en 0.1 mL hasta llegar a 0.8 mL/min. Y déjelo correr durante 10 minutos para que la fase móvil desplace al solvente de guardado de columna. Verificar que el sistema no tenga fugas de la fase móvil, en caso de presentarse avisar al profesor responsable.



Figura 15, Módulo del detector.

3. En el módulo del detector seleccione la longitud de onda de máxima absorbancia del 260 nm. Antes de iniciar cualquier corrida asegúrese de oprimir el botón de auto cero para ajustar el detector.
4. Encienda la computadora.

Adquisición de datos cromatográficos

1. Se da clic en el icono "clarity".
2. Se da clic en login HPLC.
3. En la siguiente ventana que se abre se da clic en "ok" (sin cambiar ninguna información).
4. Aparece el diagrama de operación del equipo, al posicionarse en la imagen del cromatógrafo la figura se divide en cuatro imágenes, hacer clic en la imagen de la columna.
5. En la nueva pantalla, en donde dice Method Setup se escribe el nombre del método, abajo aparecen los datos sobre el tipo de columna, fase móvil, el flujo, la presión, el detector y la temperatura de trabajo (los cuales ya están predeterminados para los propósitos de esta práctica, no se deben modificar). Se da click en OK.
6. Se da clic en el dibujo de la jeringa en donde se escribe la identificación (ID) de la muestra y su nombre y posteriormente se da clic en OK.

Desarrollo de la práctica

1. Con una microjeringa de punta roma se inyectan 20 μL y se presiona el botón rojo que está a la izquierda del sitio de inyección.
2. Se da clic en donde dice "data acquisition" (adquisición de los datos) y aparece la pantalla, en donde se observa el movimiento de la línea base y la consecuente aparición de los picos experimentales.
3. Al terminar la corrida del cromatograma se vuelve a apretar el botón rojo que está a la izquierda del sitio de inyección, para que el programa deje de tomar datos y se genera el reporte correspondiente con las tablas de áreas, los tiempos de retención, etc.
4. Para imprimir el cromatograma se da un click en "File", selecciónelo y posteriormente elija "Print".
5. Al término de la práctica se deberá enjuagar con agua destilada y filtrada durante 15 min la columna, posteriormente cambiar la fase móvil a una solución de guardado de columna por una mezcla 1:1 de metanol-agua y dejarla correr 15 minutos, transcurrido este tiempo se va disminuyendo el flujo de 0.1 en 0.1 mL hasta llegar a 0.00 mL para poder apagar el equipo.

Reporte

1. Calcule el factor de respuesta utilizando las áreas de la corrida de la mezcla de estándares.
2. Calcule la concentración del ácido gálico con las áreas de la corrida de la muestra problema.

Cuestionario

1. Mencione tres diferencias entre el Cromatógrafo de gases y el HPLC.
2. Mencione las características de la columna para HPLC.
3. ¿Cuáles son los criterios para la elección de la fase móvil?
4. Calcule el porcentaje del componente analizado por el método de normalización.

Bibliografía

Hernández, H.L., González P.C. (2002). Introducción al análisis instrumental. Ariel, S.A. Barcelona.

Principios de cromatografía. (s.f). Recuperado el 15 de mayo de 2013 de [www.mncn.csic.es/docs/repositorio// es.../principios_de_cromatografia.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es.../principios_de_cromatografia.pdf).

Verde, C.J.R., Escamilla, H.M.L., Reyes, D.A., Malpica, S.F. (1999). Manual de prácticas de química analítica II. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. Cap. 2.

Tema VII

Electroforesis

Práctica 4. Separación de aminoácidos en zumo de frutas

Objetivo

Mostrar la utilización de la electroforesis en papel para la separación e identificación de aminoácidos. Mostrar que las moléculas sin carga, como los azúcares no se separan mediante electroforesis.

Introducción

Se denomina electroforesis al transporte de partículas cargadas en un campo eléctrico (Skoog et al., 2008). La electroforesis es una forma incompleta de la electrólisis, en la que los productos deseados, no se liberan en los electrodos, sino que sus distintos movimientos quedan detenidos en un punto intermedio entre los electrodos (Smith & Feinberg, 1979).

Si se aplica un campo eléctrico a una mezcla de moléculas cargadas, éstas migrarán al electrodo de polaridad opuesta. Cuando una molécula de carga q se encuentra en un campo eléctrico de magnitud E , la fuerza (F) que provoca la aceleración de la partícula será $F = qE$. Dicha molécula será arrastrada por una fuerza friccional f dando una velocidad resultante v , de forma que: $q = fv$

Al aplicar la ley de Stokes para una molécula esférica de radio r que se mueve a través de un medio de viscosidad n , se tiene:
 $f = 6 \pi n r$

A partir de las expresiones anteriores se obtiene: $qE = 6 \pi n r v$

La movilidad electroforética V de una molécula se define como la migración por unidad de campo de fuerza de manera que:
$$V = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} = \frac{q}{6 \pi n r}$$

Por lo tanto, la movilidad electroforética depende de la carga de las partículas y del coeficiente de fricción f , que es dependiente del tamaño de la molécula, de su forma y de la viscosidad del medio (Meloan & Kiser, 1973).

Dentro de las técnicas electroforéticas se encuentra la de zona. En esta técnica, la muestra se desplaza sobre un soporte sólido de papel, celulosa o gel. Las sustancias a separar se aplican como una mancha o una raya de la solución sobre un soporte relativamente amplio. El medio empleado como soporte es, por lo general, papel filtro, membrana de acetato de celulosa, gel de almidón, gel de agarosa y gel de poliacrilamida (Rubinson & Rubinson, 2000).

¿Por qué electroforesis en papel?

El papel filtro es barato, de fácil manejo, no representa riesgo para los estudiantes y es posible obtener el «**electroforetograma**» en el tiempo asignado en la sesión de laboratorio (3 h). En la práctica, la muestra se aplica sobre una tira de papel filtro, bien sea en el centro o en cualquiera de los extremos del papel, dependiendo de las sustancias a separar y del pH del amortiguador. El revelado se realiza empleando los mismos métodos que en cromatografía en papel, mediante la acción de colorantes (Smith & Feinberg, 1979).

¿Y en dónde se aplica la electroforesis en papel?

Se emplea principalmente en la separación de aminoácidos, péptidos, nucleótidos y moléculas cargadas de peso molecular pequeño, aunque también se ha usado para separar proteínas de suero (Smith & Feinberg, 1979).

Materiales		Reactivos
1	Equipo de Electroforesis horizontal	Ácido aspártico, 10 mg en 1.0 mL de isopropanol al 10% v/v.
1	Fuente de poder	Leucina 10 mg/ mL.
1	Hoja de papel Watman # 1, para Cromatografía	Lisina 10 mg/ mL.
3	Vasos de precipitado de 25 mL.	Piridina.
1	Papel filtro para filtrado rápido, empleado para separaciones cualitativas	Disolución amortiguadora de referencia de pH 7.
1	Embudo	Disolución amortiguadora, pH 6.1: (10.0 mL de piridina + 0.80 mL de ácido acético glacial + agua hasta completar 250 mL). También se puede emplear como buffer de corrimiento disoluciones de ácido acético 0.10 M o amoníaco 0.10 M.
1	Potenciómetro	Acetona.
1	Charola de inmersión	Ninhidrina: (se disuelven 200 mg en 100 mL de acetona).
1	Micropipeta de 10 – 100 µL	Nitrato de plata.
1	Micropipeta de 25 a 1000 µL	Hidróxido de sodio.
1	Puntas desechables	Etanol.
1	Regla	Agua destilada.
1	Tijeras o cúter	Revelador de carbohidratos: (Se mezcla 1 volumen de la disolución saturada de nitrato de plata en agua con 200 volúmenes de acetona. Hidróxido de sodio al 0.5 % en etanol).
1	Estufa	
1	Balanza analítica	
Alumnos		
Traer guantes de cirujano por cada alumno		
1	Secadora de pelo	
1	Limón por grupo	
1	Naranja por grupo	
1	Jitomate por grupo	

Parte experimental

1. Se exprime el jugo fresco de una naranja, del limón y del jitomate, manteniéndolos por separado. Se filtran unos pocos mililitros.
2. Se cortan las tiras de papel de acuerdo al tamaño de la cámara. Trace una línea suave con lápiz a la mitad del papel. Sobre la línea pueden indicarse los orígenes con 2.0 cm de separación. Marque con el signo + el extremo que se orientara hacia el electrodo positivo. Nota: En docencia existen tres diferentes tamaños de cámaras de electroforesis horizontal (Figura 16), y se recomienda que el largo del papel sea tal que ambos extremos queden inmersos en los compartimentos de la cámara. En tanto, que el ancho no debe de exceder el soporte que separa ambos compartimentos.
3. Se baña la tira de papel en la disolución amortiguadora, y se seca. Aplique 10 –15 µL de la muestras problemas así como de los compuesto de referencia (Figura 17).

4. Coloque el papel dentro de la cámara y llene los depósitos con la disolución amortiguadora (Fig. 18).
5. Monte el aparato y aplique la corriente eléctrica. Se aplican 0.26 mA por cm del ancho de la tira de papel (Figura 19).
6. Realice el **"electroforetograma"** durante el tiempo conveniente. Apague la corriente eléctrica y desconecte los cables de la toma de corriente y quite los electrodos de la cámara.
7. Retire el papel de la cámara de electroforesis y se seca lo más rápido posible empleando un secador de pelo o bien colocándolo en la estufa entre 60 a 110 °C.
8. Vierta el reactivo de ninhidrina en la bandeja de inmersión y bañe el papel en el reactivo.
9. Caliente el papel durante dos minutos en el horno a 100-105°C.
10. Observe las manchas coloreadas de cada uno de los zumos, de la mezcla de aminoácidos y de las muestras de referencia. Marque con lápiz la posición de los aminoácidos.
11. Sumerja la tira de papel en la disolución saturada de nitrato de plata. Deje secar a la temperatura del laboratorio y luego sumérgela en la disolución de hidróxido de sodio al 0.5 % en etanol.

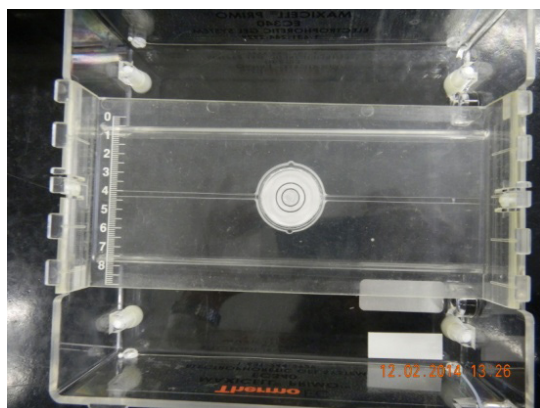


Figura 16. Cámara de electroforesis

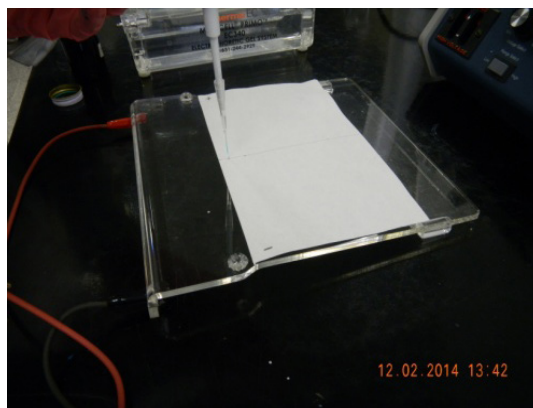


Figura 17. Aplicación de las muestras

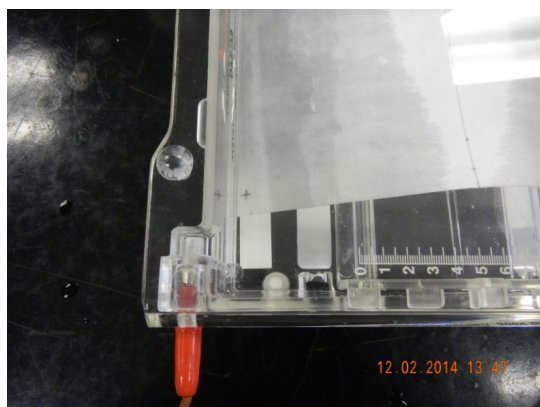


Figura 18. Orientación del signo positivo



Figura 19. Electrodo de la cámara conectados a la fuente de poder

Reporte de la práctica

1. Incluye en el informe una fotografía del electroforetograma.
2. Indique que compuestos tiene presente en a) la mezcla; b) en el zumo de naranja; b) zumo de limón y c) jugo de jitomate.
3. Indique el sitio donde se localizan los azúcares.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la razón por la cual se impregna el papel en la solución amortiguadora?
2. ¿Cuál es la razón de anotar el signo de los electrodos en el papel?
3. ¿Se pueden separar los azúcares libres mediante electroforesis en papel?
4. A una mezcla de aminoácidos, cuyos valores de pKa se indican entre paréntesis, se someten a electroforesis en papel a pH de 6.3. Alanina (2.34, 9.69), serina (2.2, 9.2), arginina (2.2, 9.0, 11.25) y ácido aspártico (2.1, 3.9, 9.8). ¿Cuál (es) migraran al cátodo? ¿Cuál (es) migraran al ánodo?

Bibliografía

- Meloan, C.E., Kiser, R.W. (1973). Problemas y experimentos en análisis instrumental. Editorial Reverté Mexicana, S.A. México, D.F. Cap 28.
- Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ª Edición. CENGAGE Learning Editores, S.A. de C.V. México. Cap 30.
- Rubinson, J., Robinson, K. (2000). Química analítica contemporánea. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Mexica. Cap 13.
- Smith I., Feinberg, I. (1979). Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis. Editorial Alhambra, S.A. España. Sección Segunda.

Tema VIII

Espectrofotometría

Práctica 5. Determinación de nitrito en agua.

Objetivo

Obtener el espectro de absorción para elegir la longitud de onda adecuada en la medición de nitrito. Determinar la concentración del NO_2^- en una muestra de agua.

Introducción

Algunos métodos químicos emplean el desarrollo de color para detectar la presencia de compuestos químicos por lo que se puede considerar a la espectrofotometría como una extensión de la inspección visual que integra un estudio más detallado de la absorción de la energía radiante por las especies químicas y proporciona una mayor precisión en su caracterización y cuantificación (Day & Underwood, 1989).

En algunos casos, las sustancias que deseamos cuantificar no presentan color por lo que deben convertirse a sustancias coloridas haciéndolos reaccionar de manera selectiva con reactivos que generen productos coloridos. Para que dichas reacciones se puedan aplicar, de manera satisfactoria, requieren que la reacción en la que se forma el color sea casi completa. Si la cantidad de producto está limitada por el analito, entonces la absorción del producto es proporcional a la concentración del analito (Skoog y cols., 2008).

La absorción de la energía también dependerá de la distancia que recorre la radiación a través de la solución. La reacción entre la concentración de la especie absorbente, la distancia que recorre la radiación y el grado de absorción se describe en la ecuación (1) que combina las leyes de Lambert y Beer (Harris, 2004).

$$A = abc \quad \text{o} \quad A = \xi bc \quad \text{ec (1)}$$

Donde A = Absorbancia

C es la concentración del soluto y se emplean con frecuencia dos unidades diferentes, gramos/litro y mol/litro. Es claro que la constante de proporcionalidad depende del sistema de concentración que se use. Cuando c está en gramos/litro, la constante de absortividad es a ; y si está en mol/litro, la constante se denomina coeficiente de absortividad molar cuyo símbolo es ξ .

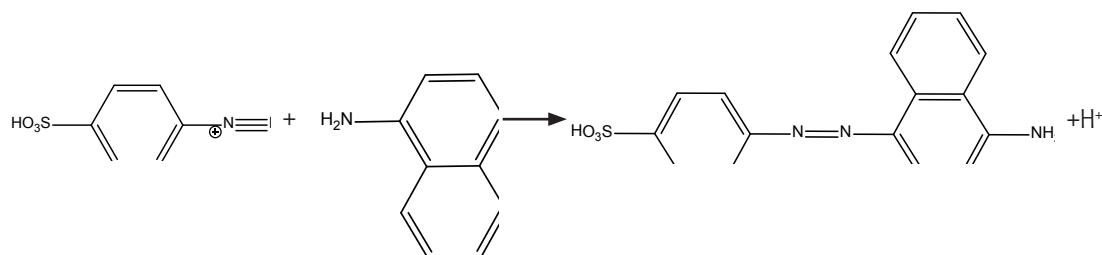
b = paso óptico

Una gráfica de la Absorbancia contra la concentración (g/L) será una línea recta con pendiente igual a ab .

La determinación del ion nitrito en agua es importante para evaluar el grado de contaminación y el proceso de purificación del agua se puede juzgar por la cantidad que contiene de dicho ion. El ion nitrito se puede determinar en el agua utilizando la reacción de este ion con las aminas (diazotización). El ácido 4-aminobencensulfónico se diazotiza de acuerdo a la siguiente reacción.



La sal de diazonio se acopla con la 1-naftilamina para formar el producto de color rosa.



Para que la reacción sea completa. La solución se alcaliniza un poco con acetato de sodio.

Materiales		Reactivos
10	Matraces volumétricos de 25 mL	Disolución de ácido sulfanílico al 0.8 % en ácido acético. Disuelva 0.2000 g de ácido sulfanílico (ácido 4-aminobenzenesulfónico) en 7.0 mL de ácido acético glacial y afore la disolución a 25 mL con agua destilada.
1	Micropipeta Eppendorf de 1000 µL	
2	Pipetas volumétricas de 10 mL.	Disolución de 1-naftilamina al 0.5 % en ácido acético. Disuelva 0.1250 g de 1-naftilamina en 7.0 mL de ácido acético glacial y afore a 25 mL con H ₂ O destilada.
1	Probeta de 20 mL	
1	Piseta con agua destilada	Disolución de acetato de sodio 16.88 %. Disuelva 7.000 g de acetato de sodio trihidratado en agua y afore a 25 mL.
	Puntas para la micropipeta	
1	Espectrofotómetro	Pese con exactitud 0.0150 g de nitrito de sodio grado reactivo, disuelva la sal en agua y afore a 100 mL. Mida 10.0 mL de esta disolución y adicione agua hasta un volumen final 100 mL. Esta nueva disolución contiene 0.010 mg de nitrito/mL, y es la que empleará para realizar la curva de calibración.
2	Celdas para el espectrofotómetro.	
4	Vasos de precipitado de 100 mL	

Parte experimental

1. Prepare la serie de disoluciones que se indican continuación.

Matraz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NaNO ₂ (mL)	0.0	0.250	0.500	0.750	1.00	1.5	2.0	2.5	0.0	0.0
Muestra problema (mL)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0
H ₂ O destilada, (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	---	---
Ác. sulfanílico, (µL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Deje reposar los matraces 5 minutos										
1-naftilamina, (µL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Acetato de sodio, (µL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Afore con H ₂ O destilada hasta la marca del matraz de 25.00 mL.										

- Obtenga el espectro de absorción midiendo la absorbencia del tubo cinco empleando el tubo 1 como blanco a diferentes longitudes de onda en el intervalo de 400 a 600 nm. Tome la lectura como se indica.

λ , nm	400	430	460	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	600
A														

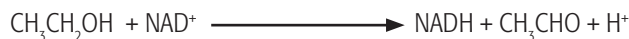
- Seleccione la longitud de onda en la cual obtuvo la absorbencia más alta y emplee dicha longitud de onda para medir la absorbencia de las disoluciones estándar y de la muestra problema.

Informe de la práctica

- Grafique la absorbencia contra la longitud de onda y una los puntos para obtener el espectro de absorción. Indique la longitud de onda seleccionada.
- Grafique la absorbencia contra la concentración de NO_2^- (ppm) y verifique si obedece la ley de Lambert-Beer.
- Calcule el coeficiente de absortividad y la ecuación de la recta.
- Calcule la concentración de nitrato en ppm (mg/L) en la muestra de agua analizada.

Cuestionario

- ¿Cuáles son las causas de las desviaciones de la Ley de Lambert-Beer?
- ¿Existe diferencias entre el método empleado y el aprobado por la norma oficial mexicana?
- Cuando el compuesto orgánico 3-ciano-5-metilpiridina (masa molar de 118.14 g/mol) se disuelve en etanol presenta una banda de absorción ultravioleta en 272 nm. Una solución que contiene 0.274 mg de este compuesto en 10.0 mL de etanol dio una absorbencia de 0.700 en una celda de 1.00 cm. Calcule a) la absortividad y b) la absortividad molar del compuesto a 272 nm.
- Después de un accidente automovilístico se llevó al laboratorio a una persona para realizarle una prueba de alcohol en la sangre, para lo cual se le tomó una muestra de sangre y separó por centrifugación el plasma de las células y se extrajo 200 μL del plasma con una micropipeta y se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL. Posteriormente adicionó un amortiguador de fosfatos de pH 7.00 seguido de un exceso de NAD^+ y un poco de la enzima alcohol deshidrogenasa. Después de unos minutos, la solución se aforó a 25 mL y se midió la absorbencia en una celda de 1.00 cm. El valor de absorbencia fue de 0.986. Calcule la concentración de alcohol (masa molar de 46 g/mol) en mg por cada 100 mL de plasma sanguíneo. Considere que el coeficiente de absortividad molar de NADH a 340 nm es de $6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y la reacción redox:



Bibliografía

- Day, Jr R.A., Underwood, A.L. (1989). Química analítica cuantitativa. 5ª Edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México. Cap. 14.
- Harris, D.C. (2004). Análisis químico cuantitativo. 2ª edición. Editorial Reverté, S.A. España. Cap. 19.
- Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ª Edición. CENGAGE Learning Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 14.

Práctica 6. Espectrofotometría

Análisis de mezclas

Objetivo

Corroborar la hipótesis de que la absorbencia de una mezcla a una longitud de onda dada es aditiva.

Determinar la composición de los componentes de la mezcla.

Introducción

Con frecuencia se requiere conocer la concentración de dos o más sustancias en una mezcla y si dichas sustancias absorben luz, es posible analizar la mezcla sin tener que separar los compuestos de interés (Meloan & Kiser, 1973).

Las características que deben de presentar los compuestos susceptibles de ser analizados por este método es el que sus espectros presenten longitudes de onda de absorción máxima diferente y que los coeficientes de absortividad (**a**) en sus máximos de absorción también sean diferentes (Harris, 2004).

Dado que la absorbencia (**A**) de una disolución a una longitud de onda es la suma de las absorbencias de cada una de las especies en la disolución a una determinada longitud de onda (Skoog y cols., 2008) por lo que la absorbencia de la mezcla es:

$$A^{\lambda_1} = \sum_i A_i^{\lambda_1} \quad \text{ec (1)}$$

Donde: A^{λ_1} es la absorción total de la muestra a la longitud de onda 1.

$A_i^{\lambda_1}$ es la absorción de cada una de las especies en la disolución a la longitud de onda 1.

En esta práctica se analizará una mezcla con dos indicadores a los que denominaremos R y V. Dado que los colores que presentan por separado los compuestos R y V son diferentes, por lo que las longitudes de onda (λ) en las que presentan la máxima absorbencia es diferente (García-Segura y col, 2008). Si denominamos a λ_1 y λ_2 como las longitudes de onda donde la absorbencia de R y V son máximas, y dado que los compuestos siguen la Ley de Lambert-Beer, podemos escribir las absorbencias a las longitudes de onda a λ_1 y λ_2 (Harris, 2004; Willard et al., 1991) como:

$$A_{\text{mezcla}}^1 = a_R^1[R] + a_V^1[V] \quad \text{Longitud de onda 1 ec (2)}$$

$$A_{\text{mezcla}}^2 = a_R^2[R] + a_V^2[V] \quad \text{Longitud de onda 2 ec (3)}$$

Donde los coeficientes de absortividad (**a**) se aplican a cada especie para cada longitud de onda. Dichos valores se obtienen al realizar curvas de calibración por separado de cada uno de los colorantes a las longitudes de onda 1 y 2 con concentraciones suficientes de la disolución patrón para estar seguros de que se cumple la ley de Lambert-Beer en un intervalo de absorbencia que incluya la absorbencia de la muestra (Skoog y cols, 2008).

Las concentraciones de R y V en la mezcla se obtiene al resolver las ecuaciones (2) y (3), y el resultado es:

$$[R] = \frac{(A_1 \text{ mezcla})(a_2 V) - (A_2 \text{ mezcla})(a_1 V)}{(a_1 R)(a_2 V) - (a_2 R)(a_1 V)} \quad \text{ec (4)}$$

$$[V] = \frac{(a_1 R)(A_2 \text{ Mezcla}) - (a_2 R)(A_1 \text{ mezcla})}{(a_1 R)(a_2 V) - (a_2 R)(a_1 V)} \quad \text{ec (5)}$$

NOTA: Las ecuaciones (2) y (3) representan un sistema de ecuaciones simultáneas y en el capítulo II de este manual, se incluye diferentes métodos para encontrar el valor de las incógnitas, que en este caso son R y V.

Materiales	Reactivos
2 Matraces volumétricos de 100 mL	Disolución R: Rojo neutro 0.010%. (Disuelve 10 mg en 70 mL de etanol. Aforar a 100 mL con etanol).
4 Pipetas graduadas de 5 mL	Disolución V: Verde de bromocresol 0.010%. (Disuelve 10 mg en 7.2 mL de NaOH 0.02 M y afora a 100 mL con agua destilada).
1 Piseta con agua destilada	Disolución de NaOH 0.02 M.
1 Espectrofotómetro	
4 Celdas para el espectrofotómetro.	
1 Gradilla	
12 Tubos de ensaye	
3 Vasos de precipitado de 50 mL	

Parte experimental

Obtención de los espectros de absorción y corroboración de la aditividad de la absorbencia.

1. Prepare las disoluciones que se indican a continuación:

No. tubo	Rojo neutro, mL,	Verde de bromocresol, mL	NaOH 0.020 M, mL	H ₂ O mL
1	0.0	0.0	1.0	5.0
2	2.0	0.0	1.0	3.0
3	0.0	2.0	1.0	3.0
4	2.0	2.0	1.0	1.0

2. Obtenga el espectro de absorción midiendo la absorbencia de cada uno de los compuestos y la absorbencia de la mezcla empleando el tubo 1 como blanco a las diferentes longitudes de onda en el intervalo de 400 a 600 nm. Tome la lectura como se indica.

λ , nm	400	420	440	460	480	500	520	530	540	545	550	560	580	600
Ar														
Av														
A _{mezcla}														

3. Con base a los datos anteriores seleccione la **longitud de onda** en la cual la absorbencia es máxima para el rojo neutro y el verde de bromocresol. Estas son las longitudes con las que va a trabajar.

Obtención de datos para las curvas de calibración

1. Prepare la siguiente serie de disoluciones, empleando como stock la disolución al 0.010 % y obtenga la absorbencia a las longitudes de onda elegidas. Emplee el tubo 1 como blanco.

Tubo	1	2	3	4	5	6
mL de rojo neutro	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
mL de NaOH 0.020 M	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
mL H ₂ O	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0
A λ_1						
A λ_2						

2. Prepare la siguiente serie de disoluciones, empleando como stock la disolución de verde de bromocresol 0.010%, y obtenga la absorbencia a las longitudes de onda elegidas. Emplee el tubo 1 como blanco.

Tubo	1	2	3	4	5	6
mL de verde de bromocresol	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
mL de Agua	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0.0
mL NaOH 0.020 M	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
A λ_1						
A λ_2						

3. Prepare los tubos que a continuación se indica para obtener la Absorbencia de la mezcla problema. Emplee el tubo 1 como blanco.

Tubo	1	2	3
mL de mezcla problema	0.0	2.0	4.0
mL de Agua	5.0	3.0	1.0
mL de NaOH 0.020 M	1.0	1.0	1.0
A λ_1			
A λ_2			

Informe de la práctica

1. Construye los espectros de absorción de las disoluciones de rojo neutro y verde de bromocresol en la misma gráfica. También incluya en esta gráfica el espectro de la mezcla.
2. Indique las longitudes de onda seleccionadas.
3. Curvas de calibración. Calcule la concentración en mg/mL del rojo neutro en cada uno de los tubos y gráfíquelos contra las absorbencias. Obtenga las ecuaciones de la recta y los coeficientes de absortividad a las dos longitudes de onda.

4. Calcule la concentración en mg/mL del verde de bromocresol en cada uno de los tubos y gráfíquelos contra la absorbencia. Obtenga las ecuaciones de la recta y los coeficientes de absortividad a las dos longitudes de onda.
5. Encuentra la concentración del rojo neutro y verde de bromocresol en la muestra problema.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las fórmulas y las masas molares del rojo de neutro y verde de bromocresol?
2. Emplee los datos obtenidos en esta práctica para que calcule los coeficientes de extinción molar a las dos longitudes de onda del rojo neutro y verde de bromocresol.
3. ¿Cuántas longitudes de onda se deben emplear para analizar los componentes de una mezcla de 3 compuestos? ¿Cuántas ecuaciones se necesita para obtener los componentes de la mezcla?
4. Una solución 1×10^{-3} M de un medicamento tiene absorbencias de 0.400 y 0.019 a 272 nm y 345 nm respectivamente. La solución de su metabolito a una concentración de 1×10^{-4} M presenta absorbencias de 0.000 y 0.460 a 272 nm y 345 nm respectivamente. De una muestra de orina de un paciente se extrae el metabolito y el medicamento y posteriormente se diluye a 100 mL y los valores de absorbencia obtenidos a 272 y 345 nm son de 0.325 y 0.78 respectivamente. Calcule los nanomoles de metabolito y medicamento en la muestra de 100 mL. Considere $b = 1$ cm.

Bibliografía

- Day R.A.Jr., Underwood A.L. (1989). Química analítica cuantitativa. 5ª Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana. S.A. México. Cap. 14.
- García-Segura J.M., Gavilanes J.G., Martínez del Pozo A., Montero F., Oñaderra M., Vivanco F. (2008). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. 4ª reimpresión. Editorial Síntesis S.A. España. Cap. 2.
- Harris D.C. (2004). Análisis químico cuantitativo. 2ª Edición. Editorial Reverté, S. A. España. Cap. 20.
- Meloan, C.E., Kiser, R.W. (1973). Problemas y experimentos en análisis instrumental. Editorial Reverté Mexicana, S.A. México, D.F. Cap. 2.
- Willard H.H., Merritt L. L.Jr., Dean J. A., Settle F. A. Jr. (1991). Métodos instrumentales de análisis. 1ª Edición. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México. Cap. 7.

Práctica 7. Espectrofotometría

Determinación del pK_a del azul de bromotimol

Objetivo

Apreciar la utilidad de las técnicas espectrofotométricas y potenciométricas en la determinación de constantes fisicoquímicas.

Conocer las implicaciones del equilibrio ácido-base por medio de la determinación de la constante de disociación.

Introducción

El azul de bromotimol es un ácido monoprótico orgánico de tipo débil, que se emplea como indicador en las titulaciones ácido-base, que presenta los colores amarillo (forma sin disociar) y azul (forma iónica) (Harris, 2004). Dado que el azul de bromotimol es un ácido monoprótico, se puede escribir la fórmula abreviada como HIn y la ecuación de ionización como:



La constante de equilibrio para esta disociación es:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \quad \text{ec (2)}$$

$$\text{Y equivale a } [\text{H}^+] = \frac{K_a[\text{HIn}]}{[\text{In}^-]} \quad \text{ec (3)}$$

Al aplicar la función " p " se tiene que

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \quad \text{ec (4)}$$

En la ecuación 4 se observa que los cambios de pH provocan variaciones en el valor de la relación $[\text{In}^-]/[\text{HIn}]$, y por lo tanto en el color de la disolución por lo que esta relación se puede determinar mediante espectrofotometría. Si el sistema obedece la ley de Lambert-Beer, la absorbencia resulta proporcional a la concentración y una gráfica de absorbencia en función del pH dará los mismos resultados que una de concentración en función de pH (Meloan & Kiser, 1973).

Materiales	Reactivos
7 Matraces aforados de 25 mL	Disolución de Azul de bromotimol al 0.2 %. Disuelva 20 mg en 100 mL de etanol al 20%.
2 Vasos de precipitados de 25 mL	
2 Pipetas graduadas de 2 mL	Etanol al 20 %. Coloque 20.0 mL de etanol absoluto en un matraz volumétrico de 100 mL y afore con agua destilada hasta la marca.
2 Pipetas graduadas de 10 mL	
2 Picetas (una con alcohol y otra con agua destilada)	Fosfato di ácido de sodio (NaH_2PO_4 0.200 M). Pese y disuelva 2.84 g de NaH_2PO_4 en agua y afora a 100 mL.
1 Espectrofotómetro	
3 Celdas para el espectrofotómetro	Fosfato mono ácido de potasio (K_2HPO_4 0.200 M). Pese y disuelve 3.46 g de K_2HPO_4 en agua y diluye a 100 mL.
1 Potenciómetro	
1 Probeta	NaOH 3.0 M. Pese y disuelve 3.00 g de NaOH y afore a 25 mL con agua destilada.
	Disolución Buffer pH de 7.

Parte experimental

- a. Prepare las disoluciones que se indica a continuación para obtener solo la forma disociada y la no disociada de indicador, así como proporciones diferentes de $[In^-]/[HIn]$ y apreciar la formación de varios colores.

Matraz	Azul de bromotimol, mL	NaH_2PO_4 , mL	K_2HPO_4 , mL	NaOH, mL
1	1.0	2.5	0	---
2	1.0	2.5	0.5	----
3	1.0	5.0	2.5	---
4	1.0	2.5	5.0	---
5	1.0	0.5	2.5	---
6	1.0	0.5	5.0	--
7	1.0	0	2.5	0.10

Mezcle y diluya cada disolución hasta la marca.

- b. Calibre el potenciómetro y mide el pH de las siete disoluciones que contienen el indicador.
- c. Obtén el espectro de absorción del azul de bromotimol a pH bajo (el espectro de HIn , matraz 1) y a pH alcalino (In^- , matraz 7), desde 400 hasta 640 nm. Emplee el agua como blanco. Realice las lecturas en intervalos de 20 nm, excepto alrededor de donde las absorbencias de los dos formas son cercanas, las lecturas se deben determinar en intervalos de 5 nm.
- d. Encuentre la absorbencia máxima de la forma básica (matraz 7) y con respecto a esa longitud de onda determine la absorbencia de los matraces 2, 3, 4, 5 y 6.

Informe de la práctica

- Trace en una misma gráfica la absorbencia de las disoluciones (1 y 7) contra la longitud de onda.
- Grafique los valores de A (eje de las Y) contra el pH (eje x) a la longitud de máxima absorbencia de la forma básica y obtenga el pKa.
- También obtenga la K_{ind} haciendo las siguientes consideraciones:

Con los valores de Absorbencia obtenidos en la parte d) del método experimental, obtén la constante del indicador, empleando la siguiente fórmula:

$$K_{ind} = \frac{[H^+][In^-]}{[HIn]} = \frac{[H^+][P - Q_n]}{[Q_n - R]}$$

Donde:

Q_n = Absorbencia de la solución en los matraces 2, 3, 4, 5 y 6 a la longitud de onda, en la cual la absorbencia de la forma básica es máxima.

R = Absorbencia máxima de la forma básica del indicador (matraz 1).

P = Absorbencia de la forma ácida del indicador (matraz 1) a la longitud de onda, en la cual la forma básica tiene su máxima absorbencia.

$[H^+]$ = Se calcula a partir del valor de pH de las soluciones en los matraces 2, 3, 4, 5 y 6.

4. Compare la K_{ind} experimental obtenida en la parte 3 y 4 y compárelas con la reportada en la literatura.

Cuestionario

5. Explique el por qué el azul de bromotimol tiene espectros de absorción diferentes en las soluciones preparadas en la parte a).
6. ¿Qué es el punto isobéptico? ¿Qué significa su presencia?
7. ¿Necesitan ser coloreadas las soluciones para poder realizar estudios cinéticos y de equilibrio? Fundamente su respuesta.
8. La forma ácida de un ácido monoprótico tiene una absorción máxima a 680 nm ($\log \epsilon_{680} = 6.82$), mientras que la forma básica no absorbe a esta longitud de onda. En una solución amortiguada de pH de 4.9 la absorción de una solución 3.8×10^{-5} M de ácido fue de 0.301 a 682 nm. Calcule los valores de K_a y pK_a .

Bibliografía

Harris, D.C. (2004). Análisis químico cuantitativo. 2ª Edición. Editorial Reverté S.A. España. Cap. 12.

Meloan C.E., Kiser, R.M. (1973). Problemas y experimentos en análisis instrumental. Editorial Reverté Mexicana, S.A. México. Cap. 2.

Tema IX

Radiactividad (práctica demostrativa)

Práctica 8. Radiactividad natural presente en el ambiente

Objetivo

Medir la radiactividad natural presente en el ambiente. Estudiar los tipos de desintegraciones radiactivas.

Introducción

En el esquema del átomo, el núcleo está en el centro y los electrones giran a su alrededor. El núcleo de cada átomo está formado a su vez por protones (p+) y neutrones (n). Todos los átomos de un mismo elemento tienen el mismo número de protones (número atómico, Z), y es el valor que distingue a los elementos químicos. A los átomos del mismo elemento que tiene el mismo número de protones pero diferente número de neutrones se les conoce como isótopos y se distinguen por el superíndice que indica el número de masa (protones + neutrones) (Rickards & Camaras, 1990). Por ejemplo, el Hidrógeno y el Carbono tienen tres isótopos (^1H , ^2H , ^3H , ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C), y solo el ^3H (tritio) y ^{14}C (14-carbono) son radiactivos. Ambos radioisótopos son emisores de partículas β^- (beta) pero tienen tiempos de vida media diferentes ($t_{1/2}$ del ^3H = 12.26 años; $t_{1/2}$ del ^{14}C = 5730 años (García-Segura y cols., 2008).

Un radionúclido se caracteriza por: a) el modo de decaimiento, b) el tipo de energía de la radiación emitida en el decaimiento, y c) el tiempo de vida media (Willard y cols., 1991; Rickards & Camaras, 1990).

Un grupo importante de elementos pesados, ($Z \geq 84$) pueden decaer emitiendo partículas alfa ($^4\alpha_2$), que consta de 2 protones y dos neutrones y son idénticos a los núcleos de Helio. Su carga es de +2 y su masa de 4.



Hay dos tipos de decaimiento beta (β), el de la partícula negativa (β_-) y el de la partícula positiva (β_+). La partícula β_- es un electrón con carga de -1 y masa de cero y es indistinguible de los electrones de las capas atómicas. En cambio la partícula β_+ , tiene carga de +1 y masa de cero. Cabe mencionar que en los decaimientos de tipo β , se emite también un neutrino, que carece de carga y de masa, y se omite su escritura en las reacciones debido a que no afectan el balance de dichas ecuaciones



En el decaimiento gamma (γ), se emiten los rayos γ que son fotones o paquetes de radiación electromagnética, como lo son los rayos X, luz ultravioleta, luz visible y luz infrarroja, las microondas y ondas de radio. No tienen masa ni carga y solamente constituyen energía emitida en forma de onda.

En los procesos de captura electrónica, el electrón es atrapado por el núcleo, por lo general proviene de la capa K, dejando un sitio vacante y para llenar dicho sitio, cae un electrón de la capa exterior (L, M, etc.), emitiendo de manera simultánea un fotón de rayos X.



Hay otros procesos que implican decaimiento radiactivo, transmutación de elementos y emisión de alguna radiación características. Cabe mencionar, que en la gran mayoría de las fuentes radiactivas que se usan en la actualidad, la radiactividad ha sido inducida por bombardeo de neutrones provenientes de un reactor nuclear.

Con respecto a la energía emitida, se da por la diferencia entre los niveles involucrados en el decaimiento. En caso de que las radiaciones α y γ provengan de un solo tipo de decaimiento serán monoenergéticas. Sin embargo, las radiaciones β comparten la energía disponible con el neutrino, por lo que tienen un espectro continuo de energía. La tercera propiedad se relaciona con el tiempo de vida media de un nuclido radiactivo ($t_{1/2}$) que se define como el tiempo necesario para que se desintegre la mitad de los átomos radiactivos en una muestra (Skoog y cols., 2008).

La actividad A de un radionúclido se define como su velocidad de desintegración.

$$A = - \frac{dN}{dt} = \lambda N \quad \text{ec (5)}$$

La actividad se expresa en unidades recíprocas de segundo (s^{-1}). El becquerel (**Bq**) corresponde a 1 desintegración por segundo. **1 Bq = 1 s⁻¹**. Otra unidad que aun se utiliza es el curie (**Ci**), que es igual a 3.700×10^{10} desintegraciones (eventos de decaimiento radiactivo) por segundo (**dps**), o sea que $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$.

En el laboratorio rara vez se miden actividades absolutas ya que la eficacia de los detectores no es del 100%. En su lugar, se utiliza la velocidad de conteo R .

$$R = cA = c\lambda N \quad \text{ec (6)}$$

Donde c es una constante denominada eficiencia de detección absoluta, la cual depende de la naturaleza del detector, la disposición geométrica de la muestra y el detector y de otros factores.

La detección de la radiación se basa en el efecto que produce dicha radiación sobre la materia con la que interacciona. Los diferentes tipos de radiactividad interaccionan con la materia de modo distinto, y también depende de la energía y del material sobre el que se incide. En términos generales se puede decir que las radiaciones producen los fenómenos de: ionización, transmiten energía al material, excitación de átomos, desplazamiento de átomos y cambios químicos en los materiales. La placa fotográfica fue el primer método empleado y ésta ennegrece cuando la radiación incide en ella. Los detectores que se emplean para medir la radiactividad son:

1. Placa fotográfica (rayos X, β , electrones)
2. Detectores de ionización de gases (Cámaras de ionización, detectores proporcionales, detectores Geiger-Müller) (detecta partículas β y electrones)
3. Centelladores (γ , rayos X)
4. Semiconductores
5. Detectores químicos, calorimétricos, termoluminiscentes de neutrones, etc.

En esta práctica se empleará un detector de ionización de gases (detector Geiger-Müller) que efectúa el análisis de corrientes eléctricas producidas tras la formación de los pares iónicos generados por una emisión radiactiva. La parte esencial es la cámara de ionización, la cual es un recipiente cerrado con paredes protegidas por Plomo u hormigón, para evitar que las emisiones radiactivas atraviesen sus paredes. En el interior de la cámara se encuentra un gas noble (p.ej He, Ar). Finalmente estas cámaras están provistas de dos electrodos, uno central y otro en la pared. Las emisiones radiactivas de la muestra penetran en la cámara a través de la ventana, originando pares iónicos en el gas. Al establecer la diferencia de potencial, los iones positivos irán al cátodo y de esta manera se produce una pequeña corriente eléctrica, debida a la entrada de la emisión radiactiva en la cámara. El número de iones generados por la radiación dependerá:

- a. Del tipo de gas empleado y la presión, que influyen en el potencial de ionización.
- b. De la energía de las emisiones radiactivas, ya que a mayor energía más iones.
- c. Del voltaje existente en los electrodos.

En los detectores G-M se trabaja con voltajes elevados para fomentar los fenómenos de ionización secundaria y la intensidad de las corrientes producidas por cada partícula radiactiva no depende de las radiaciones primarias, o sea que en este contador solo se puede evaluar el número de pulsos (corrientes eléctricas de corta duración) pues todos son iguales. El detector G-M es relativamente económico y sensible, tanto que a veces se usa en el laboratorio de bioquímica para detectar la presencia de radiactividad (García-Segura y cols., 2008).

Es común pensar que la exposición a las radiaciones es consecuencia a desastres ocasionados por el hombre. Sin embargo, la radiación natural forma parte del medio ambiente y sus principales componentes son los rayos cósmicos (12%), los procedentes de los radionúclidos presentes en suelos y rocas, las que se encuentran presentes en los alimentos y bebidas y el aire, por la producción de energía, así como a los que está expuesto como consecuencia de algunos tratamientos médicos (17%).

Los elementos conocidos como “padres” o cabeza de las serie radiactivas son el ^{238}U , ^{232}Th y ^{245}U , y en cada una de estas serie existe un isótopo de Rn que escapa del material natural y se incorpora a la atmósfera. Estos gases radiactivos son el ^{220}Rn , ^{222}Rn y ^{219}Rn . La radiactividad debida al Rn constituye el 40 % (Bulbulian, 1989).

Materiales

- 1 Un contador Geiger-Müller
Materiales débilmente radiactivos (barro, sal de mar, leche, madera recién cortada)
 - 1 Placa de montaje del detector y la muestra
Materiales para estudiar la atenuación (papel, lámina de aluminio, lámina de plomo)
-

Parte experimental

Medida del fondo de radiación natural

En esta parte se medirá la radiactividad (cps) que hay en el ambiente.

1. Encienda con cuidado el interruptor principal del aparato y deje que se caliente unos minutos.
2. Realice con el detector 6 medidas de dos minutos de duración cada una. Emplee un reloj pulsera o bien cuente doce periodos de 10 s.
3. Ponga a cero el reloj y el aparato contador antes de cada medición.
4. Determine el número medio de cuentas ($\bar{h}/\bar{N}_i$) y la incertidumbre.
5. Determine las cps, $\frac{dhNi}{dt}$ = No tasa de recuento debida al fondo ambiental
6. Para medir con mayor precisión, ponga en marcha el equipo contador y determine el número de pulsos durante 10 minutos (utilice el reloj de pulsera). Cuanto más largo sea el tiempo de recuento más preciso será el valor obtenido.

NOTA: El valor *no* se usará en la siguiente sección.

Estudio de la radiación de algunos materiales

1. Retire la capucha de protección del tubo GM.
2. Coloque debajo de la ventana de tubo GM, el material elegido.

3. Mida la cuentas durante 3 minutos.
4. Para cada uno de los materiales determine la tasa de recuento y la tasa neta de recuento (reste la radiación de fondo).

Si la tasa neta es diferente a cero, indica que la muestra analizada es radiactiva

Caracterización del tipo de radiación

Con base a la forma en que se atenué la radiación por diversos materiales se puede diferenciar el tipo de radiación emitida (α , β , γ).

1. Emplee la colombita para medir tres veces durante 100s, el número de cuentas. Esto se hace a una distancia fija, primero directamente. En segundo lugar, interponga una hoja de papel y posteriormente cambie la hoja de papel por una lámina de aluminio y finalmente sustituya la lámina de aluminio por una de plomo.
2. Determine la tasa de recuento neta (lectura promedio- lectura promedio de fondo).

Informe de la práctica

¿Cuál fue el valor promedio de cuentas (h/Ni) y la incertidumbre obtenida en la radiación ambiental?

¿Cuál de los materiales medidos fue el más radiactivo?

¿Qué tipo de radiaciones emitía el material radiactivo?

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las normas que debemos de seguir para minimizar los riesgos derivados de uso de radioisótopos?
2. ¿Qué equipo de protección se emplea cuando se trabaja con muestras radiactivas?
3. ¿Cuáles son los isotopos radiactivos que se emplean con frecuencia en la investigación en procesos bioquímicos?
4. ¿Cuál es tipo de radiación que se puede encontrar en las casas y a que radionúclido se debe?

Bibliografía

- Bulbulian, S. 1989. La radiactividad. La ciencia desde México/42. Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. México, D.F.
- García-Segura J.M., Gavilanes J.G., Martínez del Pozo A., Montero F., Oñaderra M., Vivanco F. (2008). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. 4ª reimpresión. Editorial Síntesis S.A. España. Cap. 1.
- Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ª Edición. CENGAGE Learning Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 32.
- Rickards, C.J., Camaras, R.R. (1990). Las radiaciones II. El manejo de las radiaciones nucleares. La ciencia desde México/94. Fondo de cultura económica, S.A. de C.V. México, D.F.
- Willard H.H., Merritt L. L.Jr., Dean J. A., Settle F. A. Jr. (1991). Métodos instrumentales de análisis. 1ª Edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A.de C.V. México. Cap. 14

Métodos Experimentales

Se terminó de imprimir en septiembre de 2015,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600