



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“DETERMINACIÓN DE TIOCIANATO EN MUESTRAS DE INTERÉS  
BIOLÓGICO POR UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO  
MEDIANTE CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ARTURO ESPINOSA MENDOZA**

**ASESOR: ELIA GRANADOS ENRIQUEZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉX,**

**2007.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERREÑA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Determinación de Tiocianato en muestras de interés Biológico por un método espectrofotométrico mediante curvas de calibración indirecta".

que presenta el pasante: Arturo Espinosa Mendoza  
con número de cuenta: 9406004-1 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 6 de diciembre de 2006

PRESIDENTE	QFI. Leticia Zúñiga Ramírez	
VOCAL	QFB. Elia Granados Enriquez	
SECRETARIO	MC. Marina Lucia Morales Galicia	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruíz	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. José Juan Escobar Chavéz	

## DEDICATORIAS

*A mi mamá por haberme dado el ser y el ejemplo de la vida la cual me ha enseñado que no es nada hostil aferrarse a la vida. Te doy gracias mamá por haberme encaminado en este sendero del saber universal, ahora solo quiero que pongas fe en mi, para que yo pueda retribuirte muchas cosas las cuales siempre con cariño me las ofreciste en forma incondicional en aquellos momentos cuando fui pequeño, joven, y hasta estos días....*

*A mi hermano Luciano por que en estos momentos de la vida te has distanciado de nuestras vidas, tengo la esperanza de que olvides aquellos rencores y que dios ilumine tu ser. Te dedico parte de este trabajo y te hago una invitación a que nunca existan prejuicios ante los dos y si yo elegí este camino, espero lo tomes como ejemplo del por qué queremos ser felices ¡Busca la felicidad!*

*Recuerda que:*

*Cuando haya oscuridad cerca, busca el sol  
cuando haya en ti amor, búscalo  
y para las esperanzas, existe el cielo  
y para los cielos quienes saben volar*

*Si de verdad lo deseas puedes oírme hablar  
sólo si deseas encontrarás un camino  
si de verdad lo deseas podrás aferrarte al día  
sólo si lo deseas volarás lejos*

*Cuando haya un viaje sigue la estrella  
cuando haya un océano navega lejos  
y para los abatidos existe el cielo  
y para el mañana quienes saben volar...*

*A Lizzeth por que siempre a estado en las buenas y en las malas, por que gracias a la vida estamos juntos y hemos vivido cosas tan maravillosas y a pesar de que siempre estemos lejos, deseo que siempre permanezca ese vinculo de hermandad que hay entre los dos.*

*A mi tía Irma por que en mí siempre infundo el camino de la sabiduría y la enseñanza la cual es un ejemplo a seguir, hoy puedo compartir este trabajo como parte de aquellos momentos, que siempre estarán en mi mente ¡gracias tía!*

*Alfonso te doy las gracias por haberme apoyado y a creer en mi, ¡por que siempre te estaré agradecido! hemos estado en las buenas y en las malas, ahora me toca a mi retribuir todo tu apoyo, lo más valioso que he aprendido de tu persona es: que me enseñaste lo más difícil de la vida, y es: ¿cómo aprender a vivir? Y... seguir adelante ¡no hay obstáculo alguno! Agradezco el que hayas forjado en mi persona, un hombre de bien para la vida.*

*A Irma Alejandra Ramírez Oropeza, Alejandro Flores, gracias por hacer contribuido por ese pedacito de tecnología el cual hasta estos momentos sirvió para concluir este proyecto.*

*A Ricky por que fuiste pieza fundamental y en la cual, iluminaste mis dudas para realizar esta tesis.*

*A linda y a germán por que este trabajo quiero que lo tomen como un reto a seguir y puedan concluir sus estudios ¡Sigán adelante!*

*¡A María! gracias por aquellos consejos y el aliciente que me diste para seguir adelante para poner mi fe en dios...*

*A mi mamá Grande...*

*Cada vez que tenía que abandonar mi hogar  
corría de regreso a los brazos de mi madre,  
un último abrazo y entonces se ha acabado.*

*Observándome, tu sabes que lloro,  
me tiras un beso para decirme adiós,  
¡siento que el cielo cae sobre mí!*

*Todo lo que soy, un niño con esperanzas  
Todo lo que tengo, son millas llenas de esperanza de hogar.*

*Si sólo pudiera estar contigo,  
mi tren se pone en marcha, te lejas de mi vista,  
ahora debo esperar hasta que se acabe.*

*Los días pasarán, tus palabras para mí,  
parecen tan lejanas; eternidad,  
pero debo esperar hasta que se acabe.*

*Mamá grande, ¡a donde estés! quiero compartir este proyecto el cual siempre anhele mostrarte, espero que algún día podamos sentarnos para platicarlo y compartirlo, cuando llegue ese momento deseo ver nuevamente tu rostro de felicidad.*

*Te extraño mucho.....*

*A la universidad la cual me ha brindado muchas oportunidades las cuales he sabido aprovechar, y a todo el personal de la facultad por haberme ofrecido su apoyo y sus servicios.*

*A la sección de Química Analítica todo su personal y sobre todo a su profesorado agradezco la estancia en esta sección.*

*A mis profesores:*

*Agradezco a la maestra Elia por creer en mí y por brindarme su apoyo académico el cual fue muy valioso para poder concluir esta licenciatura...*

*A la maestra norma laura delgado buen rostro por haber depositado en mí la esencia que hay en la gente...*

*A la maestra marina morales le doy las gracias en el asesoramiento de esta tesis.*

*Y a todos aquellos profesores por sus enseñanzas... ¡lo bien aprendido jamás se olvida!*

*A mis amigos: Guillermo y Mario les agradezco su sincera amistad... sigamos como hasta ahora! pero lo más importante es que no se den por vencidos ya falta muy poco...*

*A Alejandro: te doy las gracias por estar conmigo en esta recta final y gracias por los buenos momentos que hemos estado conviviendo con los cuates en las truchas. Que nos han servido para platicar y reflexionar sobre la vida.*

*A chucho a pesar de que has estado distante dedícale más tiempo a tu persona y los amigos no te abandones. ¡No dejes que el consumismo te consuma!*

*A mis amigas: Norma e Irma que aunque la indiferencia las haya separado a las dos, les doy un lugar especial a cada una de ustedes:*

*Norma: eres lo máximo cuando te fuiste me quede sólo, ¡y sólo yo, me reserve muchas cosas de aquel entonces! Fueron los buenos momentos que pasamos y que hasta ahora nunca olvidó, sigamos así... no seas mi juez... y olvida todo.*

*Irma: gracias te doy por brindarme tu mano y tu amistad en estos últimos años pero no critiques por que soy así, nunca quise perderlas a las dos y quiero mantener su amistad aunque sea individualmente.*

*Cada una de ustedes tiene algo especial, sin embargo, soy una persona sensible y reconozco, que no puedo ser desleal a cada una de ustedes! Y mantendré discreción para ambas partes...*

*A Mirsha por haberme brindado su amistad y las ganas de terminar esta carrera ¡ya llegamos! Y llegamos en esta última recta la cual valió la pena esforzarse, ahora podemos compartir este triunfo....*

*A Cristina que en su momento para mí fue una amistad en la cual pudimos compartir buenos momentos y en la actualidad me alegra podernos ver con gusto sigamos así....*

*A Boris: que aunque fueron pocos los momentos de convivencia siempre serán los mejores!!!*

*A Coni y a Gisela: que en estos últimos momentos su convivencia fue muy padre...*

*Felipe cuidate mucho! Hay que emprender esta amistad, échala a correr!*

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>1. OBJETIVOS.</b> .....	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCION.</b> .....	<b>3</b>
<b>3.0 GENERALIDADES</b> .....	<b>5</b>
3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS REACTIVOS Y SUSTANCIAS ORGANICAS.	6
3.2 IMPORTANCIA TOXICOLOGICA DEL TIOCIANATO. ....	9
3.3 IMPORTANCIA TOXICOLOGICA DEL HCN.....	11
3.4 FUNDAMENTO DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA .....	13
3. 4.1 LEY DE LA FOTOMETRIA .....	15
3. 4.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO .....	16
3. 4.3 MÉTODOS INDIRECTOS.....	17
3.5 ANTECEDENTES ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE TIOCIANTO.....	20
<b>4.0 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>22</b>
4.1 LISTA DE MATERIAL EQUIPO Y REACTIVOS .....	23
4.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	26
4.3 CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA LA ELECCIÓN DE LOS ANALITOS .....	27
4.4 ELABORACIÓN DE LA TIRA REACTIVA .....	30
4.5 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO( $\lambda$ ) .....	34
4.6 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO .....	36
4.7 CONFIABILIDAD DEL SISTEMA. ....	39
4.7 INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	44
<b>5.0 RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>6.0 ANALISIS DE RESULTADOS.</b> .....	<b>56</b>
<b>7.0 CONCLUSIONES</b> .....	<b>73</b>
<b>8.0 ANEXOS</b> .....	<b>74</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>85</b>
<b>INDICE DE GRAFICAS</b> .....	<b>88</b>
<b>9.0 BIBLIOGRAFIA.</b> .....	<b>89</b>



## INDICE DE TABLAS.

CONTENIDO	Páginas
Tabla 4.1: Linealidad del sistema para el estándar de tiocianato.....	40
Tabla 4.2: Linealidad para el sistema de la tira reactiva en elución de papel picrato tiempo de incubación de 3 Horas a temperatura de 30-40°C.....	41
Tabla 4.3: Linealidad para el sistema de la tira reactiva en elución de papel picrato tiempo de incubación de 6 Horas a temperatura de 30-40°C .....	42
Tabla 4.4: Concentración de SCN en Fumadores a diferentes tiempos de incubación.....	45
Tabla 5.1: Absorbancias promedio obtenidas en los estándares de tiocianato.....	47
Tabla 5.2: Absorbancias promedio obtenidas a partir de los estándares de tiocianato en la tira reactiva en un tiempo de elución de 3 horas a una temperatura de 30-40°C .....	47
Tabla 5.3: Absorbancias promedio obtenidas a partir de los estándares de tiocianato en la tira reactiva en un tiempo de elución de 6 horas a una temperatura de 30-40°C.....	48
Tabla 5.4: Comparación de concentraciones del sistema 5, para un STD. de tiocianato ...	48
Tabla 5.5: Concentración de tiocianato en [ppm] para 10 muestras de orina.....	49
Tabla 5.6: Experiencia 1. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato.....	50
Tabla 5.7: Experiencia 1. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato.....	51
Tabla 5.8: Experiencia 2. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato.....	51

Tabla 5.9: Experiencia 2. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato.....	52
Tabla 5.10: Experiencia 3. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato.....	52
Tabla 5.11: Experiencia 3. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato.....	53
Tabla 5.12: Experiencia 4. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato.....	53
Tabla 5.13: Experiencia 4. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato.....	54
Tabla 5.14: muestras de orina de personas no fumadoras.....	54
Tabla 6.1: Tabla de concentraciones equivalentes de SCN y HCN.....	59
Tabla 6.2: Cálculo del porcentaje % de en absorbancias promedio vs un solo ensayo....	63
Tabla 6.3: Cálculo del porcentaje % de en absorbancias promedio vs un solo ensayo....	64
Tabla 6.4: Parámetros estadísticos para determinar la linealidad del sistema.....	65
Tabla 6.5: Cálculo de estimación para determinar el LDD para el caso B1.....	67
Tabla 6.6 Cálculo de estimación para determinar el LDD para el caso A1.....	68
Tabla 6.7: Valores de absorbancia y concentración de tiocianato en orina de individuos fumadores y los no fumadores.....	70
Tabla 8.0: Tabla de los valores de percentiles de la distribución de t.....	79

Tabla 8.1: Absorbancias obtenidas de los estándares de Tiocianato  $\lambda = 530\text{nm}$ ..... 82

Tabla 8.2: Absorbancias obtenidas de la solución del compuesto formado en la tira de papel picrato a partir de los estándares de tiocianato en un tiempo de elución de 3horas a una temperatura de 30-40°C  $\lambda = 510\text{nm}$ ..... 83

Tabla 8.3: Absorbancias obtenidas de la solución del compuesto formado en la tira de papel picrato a partir de los estándares de tiocianato en un tiempo de elución de 6horas a una temperatura de 30-40°C  $\lambda = 510\text{nm}$ ..... 84

## INDICE DE GRÁFICAS.

CONTENIDO	Páginas
Gráfica 4.1: Linealidad del sistema para el estándar de tiocianato.....	40
Gráfica 4.2: Linealidad para el sistema de la tira reactiva en elución de papel picrato tiempo de incubación de 3 Horas a temperatura de 30-40°C.....	41
Gráfica 4.3: Linealidad para el sistema de la tira reactiva en elución de papel picrato tiempo de incubación de 6 Horas a temperatura de 30-40°C.....	42
Gráfica 5.1: Curva de calibración equivalente en el STD de tiocianato.....	50
Gráfica 5.2: Curva de calibración equivalente en el STD de tiocianato.....	51
Gráfica 5.3: Curva de calibración equivalente en el STD de tiocianato.....	52
Gráfica 5.4: Curva de calibración equivalente en el STD de tiocianato.....	53
Gráfica 6.1: Diseño de la curva de calibración para el STD de tiocianato siguiendo señal del $\text{KMnO}_4$ .....	57
Gráfica 6.2: Diseño de la curva de calibración para producir HCN a partir de SCN siguiendo la señal del compuesto en elución .....	58
Gráfica 6.3: Niveles de tiocianato en orina vs. Hábito de fumar.....	71

# 1. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

- Realizar la identificación, determinación y cuantificación de Tiocianato en orina humana mediante la utilización de curvas de calibración indirecta con el fin de proponer una técnica de análisis químico.

## OBJETIVO ACADÉMICO DEL PROGRAMA.

- Determinar Tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) en muestras de interés biológico (orina) mediante curvas de calibración espectrofotométricas como parte de la elaboración del manual de prácticas de análisis tres para cubrir los experimentos de este programa.

## OBJETIVO SOCIAL DEL PROGRAMA.

- Beneficiar a la población estudiantil de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo ejerciendo experimentos para apoyar el aprendizaje de la asignatura de análisis III y conformar parte del manual de prácticas del plan vigente.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer las condiciones experimentales de trabajo como son: pH; tiempo de reacción, temperatura, tiempo de incubación para llevar a acabo tales determinaciones.
- Estudiar algunos parámetros de confiabilidad como son: linealidad del método, reproducibilidad, y sensibilidad.
- Comparar y evaluar indirectamente la eficiencia en la recuperación de Tiocianato a partir de ácido cianhídrico fijado en una tira reactiva de papel picrato.
- Determinar indirectamente Tiocianato mediante la formación de ácido cianhídrico tanto en los estándares como en las muestras de orina y cuantificar su contenido en las mismas.
- Desarrollar un método que permita determinar Tiocianato en orina para monitorear la exposición del tabaco en una población de personas fumadoras y no fumadoras.

## 2. INTRODUCCIÓN.

En el tabaco se puede encontrar sustancias tóxicas como la nicotina, monóxido de carbono, alquitranes, monóxido de nitrógeno, etc. El tiocianato se puede utilizar como marcador biológico para medir el grado de exposición real al humo del tabaco, debido a su baja eliminación en los fluidos corporales, lo que hace de él un marcador útil para su estudio.

Uno de los componentes más tóxicos del tabaco es la nicotina, que es la sustancia más característica del tabaco, por ser la causante directa de dos fenómenos especiales en el fumador: produce efectos fisiológicos y desencadena un estado de dependencia hacia el tabaco. También se encuentra monóxido de carbono y alquitranes, que colaboran activamente como sustancias cancerígenas, Como gases irritantes: el monóxido de nitrógeno, cianuro de hidrógeno, formaldehído, fenoles, ácido fórmico y acroleínas, entre otros compuestos como ácidos orgánicos, benzoquinonas y amoniaco. Otra sustancia liberada en la combustión del tabaco es el tiocianato, que es una sustancia derivada de la cianida del tabaco en origen, tiene efectos perjudiciales propios, produciendo una alteración en el metabolismo del yodo a nivel de la glándula tiroides. <sup>(3, 22)</sup>

El tiocianato es un metabolito del cianuro de hidrógeno, un componente de la fase gaseosa del humo del tabaco. Su vida media oscila entre 10 y 14 días, por lo que puede utilizarse como un marcador de larga exposición al humo del tabaco. Su concentración puede determinarse tanto en la orina, como en la saliva o en el plasma. <sup>(4)</sup>

El tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) es un ión neutro e incoloro, forma complejos con diversos cationes, moderadamente estables y algunos coloridos, como  $\text{Fe}^{3+}$  (rojo intenso), el de  $\text{Co}^{2+}$  (azul) y el de  $\text{Bi}^{3+}$  (amarillo). Entre los incoloros está el  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ , que se utiliza como reactivo del zinc, cobre y cobalto. Ningún anión da reacción semejante; los yoduros con ión férrico, ó  $\text{IO}_3^-$  con  $\text{SCN}^-$ , dan  $\text{I}_2$ , que pueden producir confusión.

El tiocianato es un reductor débil, cuando se mezcla con oxidantes muy fuertes, como el  $\text{KMnO}_4$  separa al tiocianato en forma de ión cianuro en un medio ácido, con formación de  $\text{H}_2\text{S}$ ;  $\text{SO}_4$  y  $\text{HCN}$ .

Todos los tiocianatos (llamados antiguamente sulfocianuros o sulfocianatos) son solubles en agua, excepto los de plata y cobre, y muy poco solubles los de mercurio y plomo. <sup>(2)</sup>

Es importante resaltar que para determinar o identificar ciertos compuestos que se encuentran en sistemas con matrices complejas, por ejemplo una muestra biológica, como es la orina, la cual contiene muchos metabolitos de los cuales hay que saber identificar y hacer una determinación precisa para que se efectúe tal estudio. La medición del tiocianato tiene una baja sensibilidad y especificidad, lo que determina, incluso, la no diferenciación entre los no fumadores y los fumadores. Se ha demostrado que pueden encontrarse fuentes de dicho elemento en algunos alimentos (leguminosas, almendras, brócoli, col, rábanos, nueces, cerveza e inclusive en el maíz). Sin embargo, puede utilizarse para investigar altas exposiciones al humo del tabaco para su determinación o cuantificación.

En el presente trabajo se realizó un método que está basado en la oxidación cuantitativa de tiocianato con permanganato en medio ácido como reacción antecedente del análisis semi-cuantitativo, en el cual se diseñó una tira reactiva con papel impregnada con ácido pícrico en un medio alcalino. Basándose en el principio de la técnica de Guignard modificado, utilizando cantidades conocidas de tiocianato de potasio e imponiendo a temperatura de entre 30-40°C en un tubo cerrado con la liberación de ácido cianhídrico, el cual reaccionó con la tira de papel de picrato. Por las razones anteriores se realizó el ensayo de esta forma debido a que cuando la orina está presente en un sistema, el color violeta o cromógeno desaparece en 0.5-3min <sup>(17)</sup>, a causa de que el permanganato reacciona con un agente desconocido o reductor presente en la orina, el cual no es posible medir en el espectrofotómetro.

Además se llevó a cabo un estudio para determinar tiocianato en orina, en personas fumadoras y no fumadoras, voluntarias de edades entre 25 y 62 años ambos sexos, con el propósito de proponer, un método que permita determinar tiocianato de una manera rápida, sencilla y práctica además de otros métodos existentes.

### *3. GENERALIDADES*



### 3.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS REACTIVOS Y SUSTANCIAS ORGANICAS.

#### PERMANGANATO DE POTASIO (KMnO<sub>4</sub>).

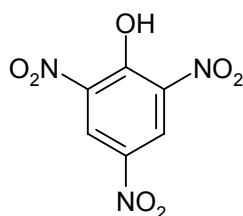
El permanganato de potasio es un sólido cristalino púrpura, soluble en agua. Es no inflamable sin embargo acelera la combustión de materiales inflamables y si esta sal se encuentra dividida finamente, puede producirse una explosión.

Es utilizado como reactivo en química orgánica, inorgánica y analítica, como blanqueador de resinas, ceras, grasas, aceites, algodón y seda; en teñido de lana y telas impresas; en el lavado de dióxido de carbono utilizado en fotografía y en purificación de agua. Se obtiene por oxidación electrolítica.

Su punto de fusión es a los 240 grados centígrados con evolución de oxígeno, tiene una densidad a 25°C de 2.703 g/ml, es soluble en 14.2 partes de agua fría y 3.5 de agua hirviendo, también es soluble en ácido acético, ácido trifluoro acético, anhídrido acético, acetona, piridina, benzonitrilo y sulfolano. <sup>(2)</sup>

#### ÁCIDO PÍCRICO (C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH)

Se le conoce como: ácido piconítrico; trinitrofenol; ácido nitroxántico; ácido carbazótico, o fenoltrinitrato.



PROPIEDADES: cristales amarillos; soluble en agua, alcohol, cloroformo, benceno y éter. Sabor muy amargo, punto de fusión 122°C; explota a 300°C.

OBTENCIÓN: por nitración del ácido fenolsulfónico, se obtiene calentando fenol con ácido sulfónico concentrado.

CALIDADES: pasta pura o pasta técnica.

PELIGROS: grave riesgo de explosión cuando se agita o calienta, especialmente con reactivos metálicos o sales metálicas.

TOXICIDAD: por absorción cutánea. VLU: 0.1mg/ml en el aire.

USOS: explosivos, cerillas, baterías eléctricas, grabados de cobre; mordiente en el teñido textil, reactivo; picratos.

PRECAUCIÓN: causa irritación. Evítese contacto con ojos, piel y ropa. En caso de contactos, lávese con abundante agua.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD: almacene a 15-30°C. Estable hasta la fecha de caducidad, si el frasco está bien cerrado.

DETERIORACIÓN: el reactivo debe ser claro, una solución amarilla. Una coloración anaranjada roja y/o turbia indica deterioro. <sup>(14, 21)</sup>

### **ÁCIDO CIANHÍDRICO (HCN)**

PROPIEDADES: líquido blanco acuoso a temperaturas por debajo de 26.5°C; débil olor a almendras amargas; el producto comercial es de 96-99% de pureza; densidad de 0.688g/mL líquido a 20-24°C y de forma de gas una densidad de 0.938g/L el punto de ebullición de es de 25.6°C; y el punto de congelación es de -13.3°C; el punto de inflamación es de menos 17.7°C; soluble en agua la solución es débilmente ácida, sensible a la luz cuando no esta totalmente puro o estabilizado polimeriza espontáneamente con violencia explosiva. Miscible con agua, alcohol, soluble en éter. Temperatura de auto ignición 537°C.

OBTENCIÓN: a) por reacción catalítica de amoníaco y aire con metano o gas natural; b) por recuperación de los hornos de coque; c) de carbón bituminoso y amoníaco a 1250°C. HCN se encuentra presente en algunas plantas (almendras, adelfas).

PELIGROS: inflamable, peligroso riesgo de incendio, límites explosivos en el aire 6-41%. Tóxico por ingestión, inhalación y absorción cutánea. VLU: 10ppm. En el aire.

USOS: manufactura de Acrilonitrilo, Acrilatos, Adiponitrilo, sales de cianuro, colorantes, rodenticidas, pesticidas. <sup>(14, 21)</sup>

### **TIOCIANTO DE POTASIO (KSCN).**

PROPIEDADES: cristales incoloros, transparentes, higroscópicos e inodoros; sabor fresco salino. Soluble en agua; acetona, alcohol, punto de fusión.173°C, se descompone a los 500°C. Se vuelve de color pardo. Y de color verde y azul cuando se funde recobrando el mismo color cuando se enfría.

OBTENCIÓN: calentamiento con cianuro potásico con azufre.

USOS: reactivo en química analítica, producción de sulfocianuros; tiureas, estampado y teñido de tejidos, restringente y reforzador fotográfico, fabricación de colorantes sintéticos y en la medicina. <sup>(14)</sup>

### **ÁCIDO SULFÚRICO (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

Es el producto comercial más utilizado industrialmente.

PROPIEDADES: líquido aceitoso, denso, fuertemente corrosivo; de incoloro a pardo oscuro, depende de su pureza. Miscible con agua en todas proporciones. Muy reactivo, disuelve la mayoría de metales; el ácido concentrado oxida, deshidrata o sulfona la mayoría de compuestos orgánicos, a menudo causa carbonización; tiene una densidad de: 1.84g/ml en estado puro; el punto de fusión es de 10.4°C; el punto de ebullición varía de 315-338°C debido a la pérdida de trióxido de azufre durante el calentamiento a 300°C.

OBTENCIÓN: a partir del azufre, pirita (FeS<sub>2</sub>).

PELIGROS: fuerte irritante para los tejidos. VLU: 1mg/m<sup>3</sup> en el aire.

USOS: fertilizantes, productos químicos, colorantes y pigmentos, como catalizador de alquilación, reactivo de laboratorio, explosivos industriales y electrogalvanizado. <sup>(14)</sup>

### **BICARBONATO DE SODIO (NaHCO<sub>3</sub>).**

PROPIEDADES: polvo blanco o terrones cristalinos, sabor refrescante ligeramente alcalino; soluble en agua, insoluble en alcohol, estable en aire seco, se descompone en aire húmedo; densidad 2.159g/ml; punto de fusión: 270°C pierde dióxido de carbono

OBTENCIÓN: principalmente tratando una solución con dióxido de carbono para precipitar el bicarbonato menos soluble; también purificando el producto crudo del proceso Solvay.

USOS: fabricación de sales y bebidas efervescentes, aguas minerales y artificiales, polvos de cocer, reactivo en análisis químico, chapeado electrónico con oro y platino; extintores, antiácido, y conservador en alimentos. <sup>(14)</sup>

### 3.2. IMPORTANCIA TOXICOLOGICA DEL TIOCIANATO.

El paso inicial en la biosíntesis de hormonas tiroideas es la captación de yoduro a partir de la circulación, y el transporte contra un gradiente a través de las células foliculares hacia la luz del folículo. Diversos aniones actúan como inhibidores competitivos del transporte de yoduro en la tiroides, entre ellos el tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ).

El tiocianato es un potente inhibidor del transporte de yodo y un sustrato competitivo para la peroxidasa tiroidea, pero parece no estar concentrado en la tiroides. Consiste en el bloqueo del mecanismo de captación de yodo el cual tiene un efecto perjudicial sobre el eje tiroideo-hipofisiario, parecido al de la deficiencia de yodo. Las concentraciones sanguíneas de tiroxina y triyodotironina disminuyen, lo que da por resultado un incremento compensador de la secreción de la hormona estimulante de la tiroides por la hipófisis. La hipertrofia e hiperplasia de las células foliculares después de exposición sostenida da por resultado un aumento en el peso de la tiroides y la aparición de bocio. <sup>(3)</sup>

Los tiocianatos de sodio y potasio ( $\text{NaSCN}$  y  $\text{KSCN}$ ) fueron usados antiguamente para el tratamiento de la hipertensión arterial, pero en la actualidad se han reemplazado. La cifra sérica letal de tiocianato es de 20mg/100ml. Se ha registrado más de 20 muertes producidas por envenenamiento por tiocianatos.

Se ha encontrado que los tiocianatos deprimen las actividades metabólicas de todas las células, pero estos efectos son más evidentes en el cerebro y en el corazón. El tiempo requerido para reducir un 50% el valor sanguíneo de tiocianatos, es aproximadamente una semana si la función renal es normal. En presencia del deterioro de la función renal, la excreción aun es más lenta y se aumenta la posibilidad de reacción tóxica. Los hallazgos patológicos incluyen lesión miocárdica, lesión cerebral focal, crecimiento tiroideo y tromboflebitis.

## DATOS CLINICOS

La principal manifestación de envenenamiento por tiocianatos es el comportamiento psicótico.

- A. Envenenamiento agudo (por ingestión): los síntomas son desorientación, debilidad, hipotensión arterial, confusión, comportamiento psicótico, espasmos musculares, convulsiones y muerte.
- B. Envenenamiento crónico (por ingestión): el uso prolongado de estos compuestos puede causar dermatitis, urticaria y hemorragia anormal. La tiroides puede encontrarse incrementada de su tamaño normal
- C. Datos de Laboratorio: la cifra sanguínea de tiocianatos nunca debe exceder de 10mg/100ml.

### *Prevención*

El Tiocianato no debe ser administrado con fines terapéuticos.

### *Tratamiento:*

- A. Envenenamiento crónico: discontinuar el uso del Tiocianato
- B. Envenenamiento agudo:
  - 1. Medidas de urgencia: Eliminar el Tiocianato ingerido, mediante lavado gástrico o emesis.
  - 2. Medidas Generales: administrar de 2 a 4Lt. de líquidos por vía bucal o vía intravenosa (IV) diariamente, si la función renal es normal, para mantener un gasto urinario adecuado. Y eliminar el Tiocianato mediante diálisis peritoneal o hemodiálisis si es necesario. <sup>(8)</sup>

### 3.3. IMPORTANCIA TOXICOLOGICA DEL HCN.

El ácido cianhídrico es un líquido volátil, incoloro de olor característico a almendras amargas que presenta gran difusibilidad debido a su elevada tensión de vapor. Las sales de cianuro (sodio y potasio) son de interés toxicológico. El cianuro de sodio es más tóxico que el de potasio por que desprende más HCN por gramo de compuesto.

El mecanismo de acción tóxica lo ejerce inhibiendo la citocromooxidasa bloqueando de este modo la respiración celular generando hipoxia o anoxia citotóxica. También inhibe proteínas que posean hierro en su estado de oxidación (+III) como es la metahemoglobina.

La sintomatología puede ser de tipo aguda con pérdida inmediata del conocimiento, convulsiones, rigidez muscular, la muerte ocurre en pocos minutos. La intoxicación aguda presenta tres períodos. En el primero se presenta ardor y anestesia en la boca del estómago, seguido de vértigos y zumbidos. En el segundo período se manifiesta pérdida del conocimiento con convulsiones, contractura o espasmos en los maxilares, pulso irregular, cianosis, etc. En el tercer período se presenta relajación muscular y muerte por parálisis del centro respiratorio bulbar y paro cardíaco.

La etiología de la intoxicación con ácido cianhídrico (HCN) descrita es muy variada. Las principales fuentes de compuestos cianurados son ciertas industrias en las cuales el HCN presenta aplicaciones comerciales como son la Galvanoplastia, extracción de metales como el oro y la plata, producción de gomas sintéticas, resinas acrílicas, poliuretano, manufactura de plásticos, así como el empleo de HCN para la desinfección como insecticida y raticida.

Otra fuente de compuesto cianurados son los alimentos, como algunos productos vegetales que contienen glucósidos cianogénicos que por hidrólisis (ácida, alcalina o enzimática) dan origen al HCN. Entre estos se encuentran especies de hongos, semillas de lino, sorgo, almendras amargas, mandioca, habas, así como en semillas de manzanas, peras, duraznos, y en algunas bebidas fermentadas; en el uso farmacológico como antitusígeno en el agua de laurel. En el pasado se empleaba en ejecuciones en la llamada cámara de gas durante la segunda guerra mundial y se han registrado muchos casos de intoxicaciones voluntarias y homicidas. <sup>(4, 8, 16)</sup>

## **Consideraciones generales de la analítica toxicológica**

La investigación o determinación de ácido cianhídrico puede realizarse con diferentes tipos de muestra: vísceras (que necesitarán una previa disgregación), líquidos biológicos, sangre u orina. En alimentos (productos vegetales o animales) y medicamentos.

La sangre venosa presenta un color rojo vivo característico. En cadáveres frescos se observa un color rojo cereza así como manchas de color más o menos intenso. El olor que lo caracteriza, almendras amargas que desprenden los órganos se observan numerosas hemorragias pequeñas.

El recipiente que contiene la muestra debe estar escrupulosamente limpio, seco y cerrado herméticamente para evitar pérdidas. Si el material es visceral, no debe conservarse en formol por que reacciona con el ácido cianhídrico formando cianhidrinas de las que no se puede liberar el ácido cianhídrico. Las muestras deben conservarse en frío para evitar la acción enzimática y bacteriana sin agregado de conservadores.

Existen tres tipos de determinaciones del ácido cianhídrico: los ensayos inmediatos o preliminares, los ensayos mediatos y los ensayos cuantitativos. <sup>(4)</sup>

### 3.4. FUNDAMENTO DE LA ESPECTROFOTOMETRIA

La espectrofotometría estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia. <sup>(11, 18, 20)</sup>

La radiación electromagnética está constituida por formas de energía radiante diferentes entre si (rayos X, ondas de radio, visible, rayos cósmicos) como se muestra un espectro electromagnético. <sup>(19)</sup>

Todas estas formas de radiación pueden describirse en función de dos modelos el ondulatorio y corpuscular (fotones).

El modelo ondulatorio describe a la radiación como ondas viajando a la velocidad de la luz  $3 \times 10^{10}$  cm/seg. en el vacío. Se utilizan varios términos y relaciones para describir la onda, tales como la longitud de onda ( $\lambda$ ), frecuencia y número de onda.

- La longitud de onda es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente. La dimensión de la longitud de onda corresponde a la de una longitud (L).
- La frecuencia es el número de ondas que pasan por un punto dado en la unidad de tiempo. La dimensión de la frecuencia es la inversa del tiempo ( $t^{-1}$ ) y la unidad usual es el segundo. <sup>(19)</sup> La frecuencia y la longitud de onda vienen relacionados por:

$$V = C / \lambda$$

Donde C es la velocidad de la radiación.

El modelo corpuscular describe a la luz como un flujo de partículas. Cada partícula (fotón) lleva asociada una cantidad definida de energía. La energía de un fotón sólo depende de su frecuencia, como se deduce de:

$$\xi = h\nu$$

Donde  $\xi$  es la energía (en erg) de un fotón;  $\nu$ , la frecuencia de radiación monocromática; y  $h$  una constante universal, llamada constante de Plank;  $h = 6.625 \times 10^{-27}$  erg/seg. <sup>(19, 20)</sup>



Cuando la radiación electromagnética viaja a través de un medio que contiene átomos, moléculas o iones, pueden suceder varias cosas:

- 1) la intensidad de la energía emergente es idéntica a la intensidad de la energía incidente. Esto indica que no ha habido absorción de la radiación.
- 2) Puede haber reflexión, refracción o dispersión.
- 3) La intensidad de la energía emergente es menor que la de la energía incidente. Esto indica que ha habido cierta absorción. Como resultado de esta absorción, las especies en la solución se activan desde su menor nivel de energía (estado basal) a estados de mayor energía (estados excitados).<sup>(18)</sup> Este salto de energía de un nivel a otro se conoce como transición, y el componente energético que participa en el proceso de absorción se especifica como transiciones de rotación, de vibración y electrónicas.<sup>(18, 19)</sup>

La luz visible y la ultravioleta proporcionan suficiente energía para las transiciones electrónicas. Los espectros ultravioleta y visible se conocen como espectro electrónico.<sup>(18)</sup> El espectro electrónico de una molécula es el resultado de una transición entre dos niveles energéticos electrónicos diferentes.

Los datos más útiles que son posibles de obtener, a partir del espectro de absorción, son la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ) y la absorbancia. Tal información espectral sirve para identificar un compuesto, estableciendo la presencia o ausencia de grupos funcionales y sus posiciones relativas en la molécula.

Las técnicas espectrofotométricas están basadas en la capacidad que tienen las sustancias de interactuar con frecuencias de radiación característica.<sup>(18)</sup> La parte de la molécula que absorbe luz se denomina cromóforo.<sup>(20)</sup> Los disolventes empleados y los adyacentes a un cromóforo pueden tener influencia en la longitud de onda y la intensidad dando lugar a diferentes efectos.<sup>(18, 19)</sup> Efecto Batocrómico (desplazamiento al rojo) la absorbancia máxima cambia de una longitud de onda menor a una mayor sin variar la intensidad. Efecto hipsocrómico (desplazamiento al azul) es un desplazamiento de la longitud de máxima absorción hacia las longitudes de onda más cortas sin cambiar la intensidad. Efecto Hiperocrómico: aumenta la intensidad de la banda sin variar la longitud de onda. Efecto Hipocrómico: es un descenso de la absorbancia y por lo tanto de  $E_{max}$ .

Los grupos que no producen un incremento en la banda de absorción por si mismos, pero que unidos aun cromóforo causan cambios tanto en longitud de onda como en la intensidad de la banda se denominan Auxocromos. <sup>(20)</sup>

### 3.4.1. Ley de la fotometría

Espectrometría Atómica y Molecular: El principio operativo en el que se fundamentan ambas técnicas tiene que ver con fenómenos de interacción de la radiación con la materia; esta interacción produce ciertos efectos que dependen de la energía de la radiación utilizada. El equipo de medición cuantifica el grado de interacción comparando las intensidades de la radiación antes y después de pasar por la muestra y la relación con la concentración de la especie absorbente. <sup>(19)</sup>

La Ley de Lambert nos indica que la proporción de luz incidente absorbida por un medio que es independiente de su intensidad, pero no del espesor de la capa líquida ni de las características del medio. Matemáticamente la expresión se puede resumir como sigue:

$$K I$$

Donde K es un coeficiente de proporcionalidad, y la I es igual al grosor de la capa del líquido expresado en centímetros.

La Ley de Beer indica que la intensidad de la luz que pasa a través de una solución a una concentración **C** y un grosor **I** es la misma cuando la concentración es 2c y el grosor I/2 o cuando la concentración es c/2 y el grosor 2I, de tal manera que la **absorción** de luz es proporcional al número de moléculas del material absorbente a través de las cuáles pasa la luz. Así, si la sustancia absorbente está disuelta en un disolvente transparente, la **absorción** de la solución es proporcional a la concentración molar. <sup>(11)</sup>

Matemáticamente se expresa como sigue:

$$K E C$$

Donde **K** es el coeficiente de proporcionalidad, **E** es el coeficiente de absortividad molar

y **C** es la concentración en moles por litro. Por lo tanto combinando las dos leyes tenemos que:

### **E C I**

Los materiales que cumplen con la Ley de Lambert-Beer, o sea donde hay proporcionalidad entre la Absorbancia ( $A_s$ ) y la concentración dentro de ciertos límites de concentración, pueden ser estudiados por este método, trabajando una curva de calibración que permita la interpolación dentro del margen de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer o utilizando un estándar. Puesto que la transmitancia y la concentración están relacionadas por medio de una función logarítmica, no es posible obtener una línea recta utilizando escalas lineales. Esto no impide la utilización gráfica de una escala como curva de calibración pero es difícil deducir esta curva si se obedece la Ley de Lambert Beer, si se obedece la ley al graficar la transmitancia en función de la concentración en papel semilogarítmico se obtiene una línea recta. Las curvas de calibración son importantes para poder determinar la concentración de una sustancia, cuando esta se desconoce, es decir, interpolando esta. <sup>(11, 15)</sup>

La curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración es generalmente una línea recta cuando menos en el intervalo de concentraciones bajas, sin embargo al aumentar la concentración la curva comienza a desviarse de la línea recta y se puede doblar hacia las abscisas o hacia las ordenadas. Son varios los factores que operan en conjunto o individualmente causando esta desviación. <sup>(10, 11, 12)</sup>

Para saber a que longitud de onda se debe de realizar un espectro de absorción, es decir, medir a diferentes longitudes de onda en este caso de 450 a 580 nm, se determina cual es la  $\lambda$  mayor absorción para poder medir la absorbancia de la solución en este caso 510nm; después de esto se procede a la realización de la curva de calibración.

#### **3.4.2 Análisis cuantitativo**

Este campo representa la más grande aplicación de los métodos espectrofotométricos. Contrariamente a los procedimientos cualitativos, muchos análisis espectrofotométricos cuantitativos pueden llevarse a cabo en región visible. Las excepciones principales son los sistemas totalmente orgánicos y las sales de metales alcalinos, que ordinariamente pueden analizarse solo en el ultravioleta. Muchos procedimientos espectrofotométricos de absorción poseen la ventaja de tener una extrema sensibilidad.

Las técnicas involucradas en el análisis espectrofotométrico cuantitativo pueden clasificarse con base a cierto criterio. Una de las clasificaciones más ampliamente conocidas es la que asume una determinación de un único componente y determinaciones de dos y multicomponentes. Sin embargo, existe otra clasificación mejor que la anterior que involucra métodos directos e indirectos. <sup>(12, 20)</sup>

### **3.4.3. Métodos indirectos**

Los métodos espectrofotométricos indirectos son usados para la determinación de compuestos que por si solos no dan la propiedad. <sup>(20)</sup>

El principio fundamental de los métodos indirectos es la ejecución de alguna reacción química generando un aumento en la propiedad proporcional a la concentración del componente bajo análisis. Para este propósito, los reactivos orgánicos producen una gran variedad de complejos y compuestos que son usados.

Las reacciones que causan cambios en la propiedad incluyen oxidación, reducción, reemplazo, formación de complejos o formación de un derivado.

En los análisis inorgánicos, la formación de complejos es, probablemente, el medio más simple y efectivo para minimizar la interferencia en absorción. Existen dos razones: la mayoría de los iones inorgánicos son incoloros o absorben con una debilidad relativa y la mayoría de los agentes orgánicos apropiados para formar complejos son específicos.

Aún cuando ambos métodos directo e indirecto están basados en las mismas leyes de absorción, los procedimientos involucrados son, sin embargo, algo diferentes. En los métodos directos el contenido del componente bajo determinación es generalmente calculado por la ecuación:  $A = abc$ . En los métodos indirectos, una curva de calibración adecuada es más a menudo usada para encontrar la concentración desconocida.

#### **CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTA**

Las curvas de calibración muestran la relación de la respuesta y la concentración; para una curva de calibración indirecta es aquella donde se cuantifica el analito, en el cual, no

genera directamente alguna propiedad sin embargo, necesita de una o varias reacciones para que este genere la propiedad en el instrumento.

Se determinan experimentalmente de la siguiente manera:

1. Se prepara una serie de soluciones de concentración conocida.

Se considera la siguiente reacción:



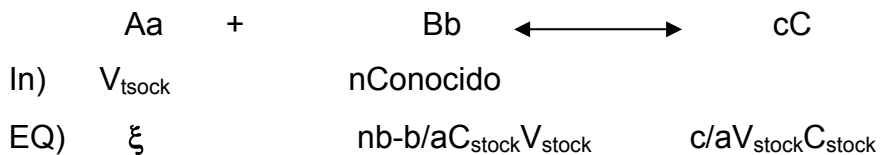
Donde:

ax = solución del estándar de concentración conocida( reactivo limitante)

Yb = reactivo que debe estar en exceso.

cz = producto que da la propiedad.

2. El reactivo o producto que genere un compuesto o sustancia diferida inicialmente pero que a su vez presente propiedad en el instrumento.



**Primer caso** la propiedad la genera el reactivo B

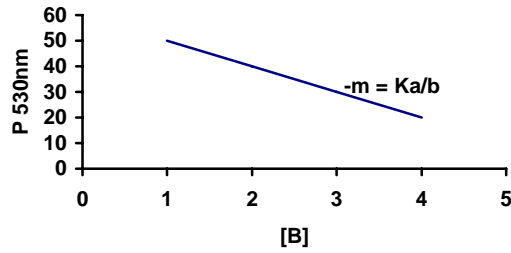
A y C no tienen ninguna propiedad.

$$P = K_1 C_B$$

$$P = K_1 \left[ \frac{nb - a/b C_{\text{stock}} V_{\text{stock}}}{V_{\text{aforo}}} \right]$$

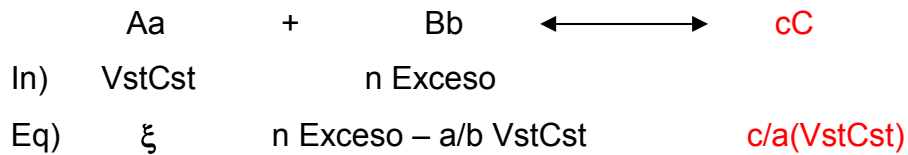
$$P = K \frac{nb}{A_{\text{foro}}} - K \frac{a}{b} \left( \frac{C_{\text{stock}} \cdot V_{\text{stock}}}{V_{\text{aforo}}} \right)$$

### La propiedad la da B



$$Y = b - mx$$

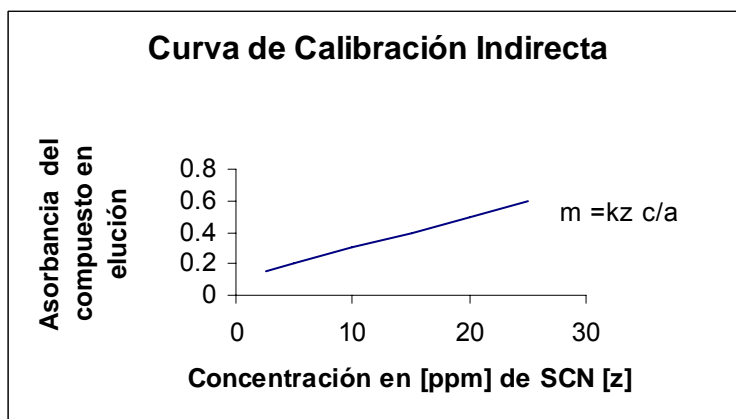
**Segundo caso** cuando la propiedad la da C, la cual tiene un interés primordial para la determinación de tiocianato.



C da la propiedad

Debe garantizarse que este en exceso

Y B no debe presentar propiedad.



### 3.5. ANTECEDENTES ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE TIOCIANATO.

En la actualidad se cuenta con una variedad de técnicas instrumentales de análisis para la determinación de tiocianato en diversos tipos muestras, cada una de estas técnicas está diseñada para determinar tiocianato de forma específica, lo cual conlleva a reconocer que todas ellas se basan en una relación que existe entre una propiedad como: absorbancia, índice de refracción, pH, área pico, potencial, conductancia, intensidad de corriente, etc. con la composición del resto del sistema. Estas determinaciones se estudian a través de dos aspectos: la naturaleza del mismo sistema (Análisis cualitativo) o bien la cantidad de algunos componentes (Análisis cuantitativo). Generalmente algunas técnicas en la determinación de tiocianato se utilizan básicamente para el análisis cualitativo, otras más en el análisis cuantitativo y un grupo de ellas es capaz de cumplir con ambos tipos de análisis.

Para determinar tiocianato en orina, por ejemplo, las investigaciones recientes se basan en el uso de una tira de papel picrato y probada en poblaciones consumidoras de mandioca, como África, y el Este de Indonesia. Este método se desarrolló por investigadores australianos y en colaboración con la población de africanos; se diseñó, mediante estudios previos realizados, los cuales consisten en medir el contenido de cianógeno en el organismo humano mediante la excreción de tiocianato a partir de éste fluido biológico, y el cual puede ser utilizado para determinar la sobrecarga de cianógeno en la población relacionada con la ingesta de raíces de mandioca y sus productos.

El tiocianato se encuentra metabolizado de esta forma en la orina, por lo tanto cuando se consume mandioca o limarin, el glucósido cianogénico esta contenido en las raíces de mandioca y el limarin; estas determinaciones se basan mediante la siguiente reacción de biotransformación en el organismo: los glucósidos cianogénicos y el limarin, son hidrolizados en dos etapas: primero son hidrolizados en acetona cianhídrica y glucosa, catalizada por la enzima linamarasa, y entonces la acetona cianhídrica es hidrolizada en acetona e hidrógeno para formar ácido cianhídrico (HCN). Basándose en estos mecanismos de biotransformación y el metabolismo humano, el HCN es separado en la conversión de cianuro y biotransformado a tiocianato en el organismo, el cual es catalizado por la enzima rhodanasa donde utiliza sulfuro, que se origina de los aminoácidos esenciales metionina y cistina, lo cual implica la reducción en el contenido esencial de aminoácidos. <sup>(4, 17)</sup>

Para la elaboración de la tira reactiva se diseñó con papel Watman No.1 de 1x13mm, y bañada de una solución de ácido pícrico la cual ha sido probada en esta población.

La técnica refiere que fue adherida la tira a una banda plástica con adhesivo común, fue inmediatamente situada al interior del frasco, el cual fue cerrado con una tapa de tornillo. Después de la incubación a 30°C por 3-16 h, el frasco fue abierto y la banda plástica fue separada del papel de picrato. El papel fue enjuagado por 30 minutos en 5.0 mL de agua con escurrimiento ocasional, enseguida se obtuvo un resultado más exacto por medio de disolver el contenido formado en la tira de la siguiente manera, el cual consiste en extraer un material de otro por medio del lavado con un solvente en este caso agua, para remover el material absorbido de un absorbente (papel); y la absorción de la solución fue medida en un espectrofotómetro. Es así como se diseñó una curva de calibración para graficar los resultados de absorbancia contra concentración, en este experimento para la determinación de tiocianato en orina. <sup>(17)</sup>

Basándose en esta determinación se propuso determinar tiocianato en orina de personas fumadoras y expuestas al humo del cigarro, de la cual se puede sustentar y apoyar referente al consumo de tabaco, mediante el mecanismo de biotransformación y excreción de tiocianato en la orina de personas fumadoras y expuestas al humo del cigarro, en la cual se puede determinar mediante esta metodología y adecuar nuevas condiciones experimentales para desarrollar la propia, con la finalidad de evidenciar y determinar este compuesto en una tira reactiva.



## *4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL*

#### 4.1 LISTA DE MATERIAL EQUIPO Y REACTIVOS.

- Equipo Espectrofotómetro JENWAY y Beckman DU-65
- 3 Fococeldas.
- Balanza analítica Mettler H72
- Parrilla: Thermolyne; Modelo: HP-A1915B Termostato; 120Volts; 750Wats.
- Termómetro marca: Taylor; escala 0-400°C.
- Un embudo de vidrio. Kimax
- 10 vasos de precipitados de 50ml. Kimax
- 2 vasos de precipitados 400ml
- 1 matraz aforado de 100ml. Pirex
- 1 matraz de aforo de 200ml. Pirex
- 1 matraz de aforo de 50ml. Kimax
- 10 matraces aforados de 10ml. Kimax
- Pipetas volumétricas de 1,2,3,4,5,6 y 20ml
- 3 pipetas volumétricas de 5ml.
- 1 perilla de hule.
- 1 Micropipeta automática 200-100µL marca: LABSYSTEMS, con capacidad de 200-1000µL.
- 60 Puntillas de plástico para micropipeta
- 1 Probeta graduada de 10 ml
- 30 tubos con tapón de rosca
- 1 gradilla con capacidad para 30 tubos
- 1 varilla de vidrio
- 1 caja petri de plástico
- Papel Whatman No.1 rectangular
- Tijeras
- 1 caja de plástico de policarbonato superficie plana 18X25cm.
- 60 Recipientes de plástico de tapón con capacidad de 50ml. (para recolectar la orina)

#### Reactivos

- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) PM: 98.08g/mol; densidad 1.84g/ml; 96.7% de pureza. J T. Baker.
- Permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) PM: 154.04g/mol; 99% de pureza. J T. Baker.
- Tiocianato de Potasio ( $KSCN$ ) PM: 98g/mol; 99.6% de pureza. J T. Baker.
- Ácido Pícrico ( $C_6H_2(NO_2)_3OH$ ) PM: 224.114g/mol. J T. Baker.
- Bicarbonato de sodio ( $NaH_2CO_3$ ). J T. Baker.
- Agua destilada.

#### Muestras

Se eligió a una población de 40 individuos hombres y mujeres sanas entre 25 y 62 años. La muestra biológica es: Orina Humana (recolectada primera muestra de la mañana).

#### Proceso de experimentación

En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales de trabajo es posible realizar ensayos preliminares como parte inicial al experimento en este caso, la parte analítica es principalmente la que estudia el orden en que suceden las reacciones químicas y el estudio de la selección de las sustancias puras, o estándares que en este caso es el tiocianato.

En primera instancia se revisó la secuencia de las reacciones que se llevaron a cabo para obtener la especie química tanto de la sustancia pura (que en lo sucesivo se le llamará analito) como de la muestra biológica en estudio (refiriéndose a la muestra de orina), que da la propiedad en el espectrofotómetro y que en el caso del presente trabajo es el HCN que proviene del  $\text{SCN}^-$ .

Analíticamente, el proceso se realiza en 2 partes, cuantitativamente y cualitativamente. En la parte cuantitativa, y como inicio en la parte experimental se realizó una curva de calibración de tiocianato donde se prepararon 7 sistemas diluidos desde 2.5ppm hasta obtener una concentración de 30ppm; de cada uno de ellos se tomaron 5ml, los cuales fueron depositados en los tubos con tapón de rosca y que a su vez fueron empleados como el medio de soporte para la tira reactiva.

Para la elaboración de la tira, se impregnó el papel con la solución de reactivo de Guignard. Una vez llevada a sequedad a T.A. Se probó su funcionalidad al introducirla en cada sistema, descritos para las disoluciones desde 2.5 a 30ppm, donde se incubó de tres a seis horas a una temperatura de 30-40°C.

En el análisis cualitativo para determinar la funcionalidad de la tira se realizó mediante la formación de HCN, al ser fijado en la misma, se llevó a cabo mediante el fenómeno de elución en el cual se obtiene un cambio de coloración (pasa del color amarillo a naranja).

Para análisis semi-cuantitativo se realizó una curva de calibración de la sustancia que se fijó, a la tira (HCN) por el proceso de elución, en seguida fue removido el componente formado (Isopurpurina) de la tira, con 5ml de agua destilada, esta solución se llevó al espectrofotómetro y se leyó a una longitud de onda de 510nm, las cuales se graficaron.

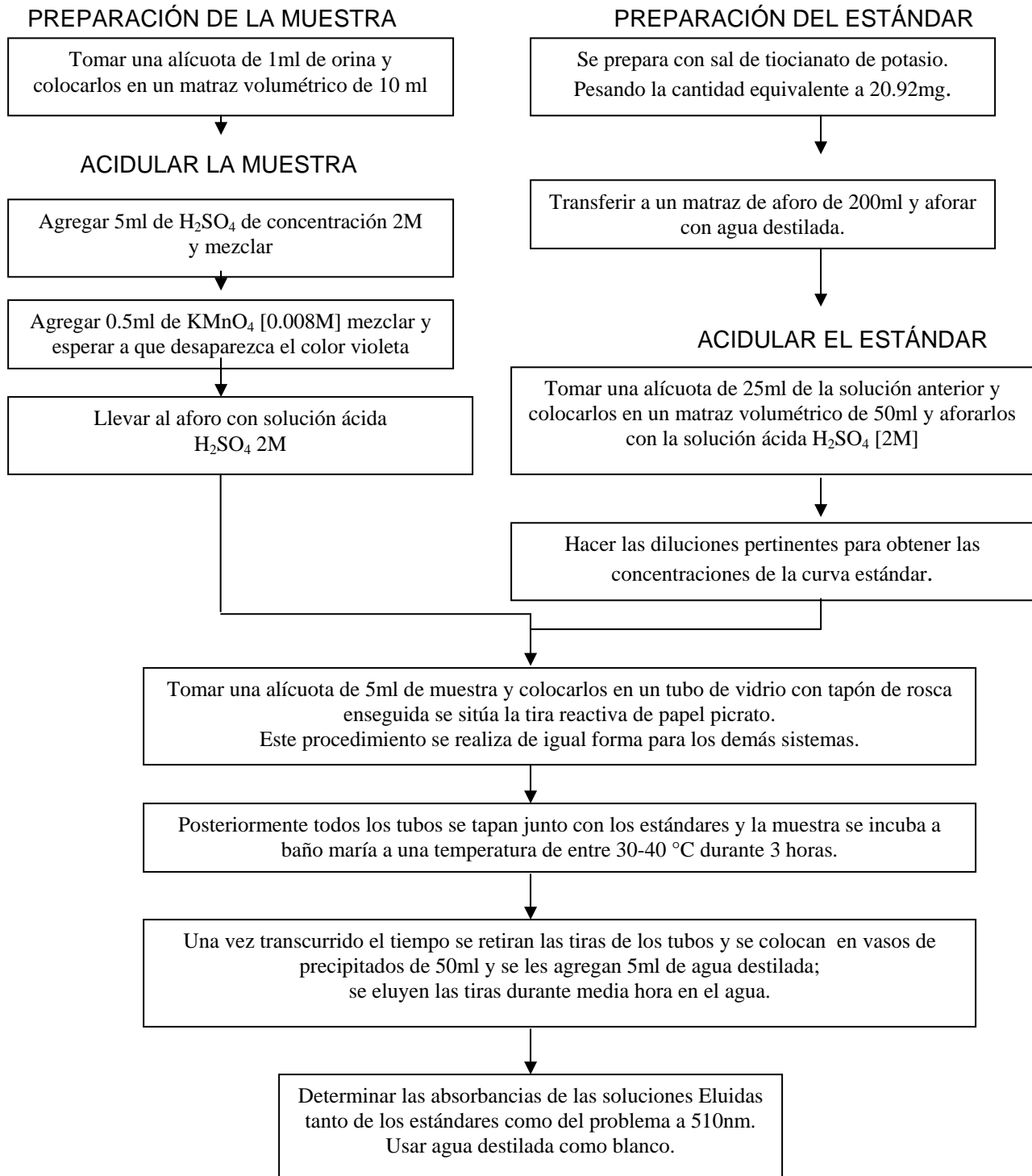
Una vez estandarizado el método, se llevó a cabo con el análisis de las muestras de orina para determinar tiocianato, midiendo la absorbancias de cada problema e interpolando en la curva de calibración descrita anteriormente.

Para llevar a cabo todos estos procesos experimentales se requirió de ciertas condiciones óptimas para la elaboración de dos curvas de calibración, la primera corresponde al analito para determinar tiocianato como parte del estándar en estudio y la segunda curva es la que define la cuantificación de tiocianato mediante la formación de ácido cianhídrico en las muestras de orina usando la tira reactiva, las cuales se enumeran y describen para realizar los ensayos experimentales.

1. **Señal en el equipo:** se midió la absorbancia del analito el cual sigue una señal en los reactivos en este caso la reacción antecedente, la cual se siguió mediante el tiocianato, el cual no genera la propiedad, sin embargo con la adición del exceso de permanganato, al reaccionar ambos generó la señal en el equipo. En la solución acuosa de la tira reactiva, se siguió la señal en los productos de la segunda reacción.
2. **Longitud de onda de trabajo:** para saber a que longitud de onda de trabajo, se realizó un procedimiento de barrido, con el sistema más concentrado (30ppm) en el cual se efectuó el espectro de absorción del compuesto (Isopurpurina), el cual se determinó siguiendo las señales (anteriormente explicadas) en el equipo, variando la longitud de onda a intervalos de 10nm y midiendo las diferentes absorbancias.
3. **pH:** este no se determinó experimentalmente ya que la concentración a la que se manejó cada sistema fue de 2M de  $H_2SO_4$  el cual asegura las condiciones de acidez y amortiguamiento, cabe mencionar que se aciduló tanto la muestra biológica como los estándares. <sup>(11, 17)</sup>
4. **Temperatura:** la temperatura seleccionada al introducir los tubos a baño maría, se determinó entre un intervalo 30-40°C; la ideal es a 35°C sin embargo en el baño maría no es factible mantener cierta temperatura constante por tal razón se determinó este rango de temperaturas.
5. **Tiempo de reacción:** el tiempo de reacción involucró a la temperatura para fijar al HCN sobre la tira reactiva y para que la sustancia formada (Isopurpurina) se pudiera evidenciar en la tira, por lo tanto se seleccionó un intervalo de tiempo de 3 a 6 horas para dar prioridad a que los componentes en la tira se conformarán.

## 4.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### PROCEDIMIENTOS GENERALES.

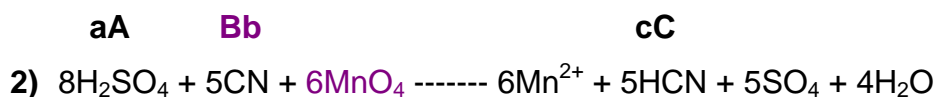
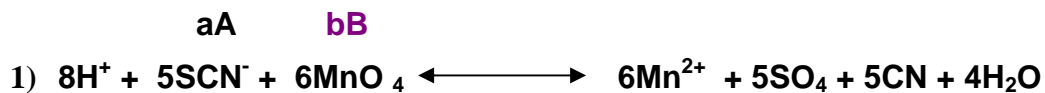


### 4.3. CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA LA ELECCIÓN DE LOS ANALITOS.

En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales es posible realizar ensayos preliminares utilizando la espectrofotometría como herramienta básica.

Para la cuantificación y determinación de sustancias se puede hacer uso de varios métodos analíticos. Uno de estos métodos utilizados en química analítica particularmente en espectrofotometría es la curva de calibración, que es una gráfica que representa el valor de alguna propiedad en función de la concentración ó volumen del analito. Lo cual implica el uso de instrumentos ópticos y electrónicos para las mediciones, no del constituyente como tal; sino de alguna propiedad (absorbancia, fluorescencia, área pico, etc.) dada por un stock de la misma naturaleza del analito (estándar) para determinar en un intervalo de concentración en el que se supone se halla la concentración de la muestra biológica, la cual es lineal y proporcional para cada disolución del estándar. <sup>(12)</sup>

Para este caso particular se empleó una curva de calibración indirecta inicialmente para el estándar de tiocianato y posteriormente se empleó una curva de calibración del compuesto formado en la tira reactiva el cual se obtuvo mediante la remoción del compuesto con agua, para éste ultimo se determinó su absorbancia mediante una nueva curva de calibración indirecta bajo ciertas condiciones de experimentación, siguiendo las siguientes reacciones.



Tomando en cuenta la primera reacción para estándar de tiocianato y la segunda reacción para la formación de HCN a partir de la primera ecuación. El HCN fue fijado en la tira de papel picrato. En esta parte es importante identificar y hacer énfasis cuál o que sustancia da la propiedad.

En la primera ecuación (1) el reactivo que es el permanganato (**MnO<sub>4</sub>**) da la propiedad o señal ya que se encuentra en exceso con respecto al reactivo tiocianato (**SCN<sup>-</sup>**).

La segunda ecuación (2) para formar HCN se requiere de hidrólisis ácida e incremento de la temperatura para formar la isopurpurina a partir de la reacción del HCN junto con el ácido pícrico de la tira reactiva. Por lo tanto el producto de la reacción da la propiedad en el espectrofotómetro.

Para construir la primera curva de calibración se emplea un estándar primario o solución Stock, semejante a la muestra biológica la cual se va analizar o determinar.

Los criterios para determinar la concentración del problema o analito a preparar, son en base al sistema del estándar o sustancia pura, los cuales se deben trabajar en el punto medio de la curva de calibración para establecer rangos de concentración promedio del analito.

### **Preparación del estándar.**

Se preparó una solución stock de tiocianato de potasio en una proporción de 2.5; 5; 10; 15; 20; 25 y 30 ppm las cuales se prepararon de la siguiente manera: una vez calibrada la balanza analítica se pesaron aproximadamente 20.92mg considerando la pureza del tiocianato este se llevó a un aforo de 200ml con solución ácida de concentración 2M.

De ésta se tomó un volumen de 25ml y con pipetas volumétricas de 0.5; 1; 2; 3; 4; 5 y 6ml se tomaron los respectivos volúmenes para obtener las concentraciones deseadas (2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 30 ppm) las cuales fueron llevadas a un aforo de 10ml nuevamente con solución de ácido sulfúrico de concentración 2M. En estas disoluciones se nombró sistema 1 el cual corresponde a 2.5ppm y el sistema 7 que corresponde a 30ppm para este caso se seleccionó el sistema 1, en el cual esta contenido el exceso de permanganato y que también se empleó para determinar su longitud de onda en el estándar de tiocianato; con estos sistemas que van del 1 a 7 se midió sus absorbancias y se trazó la primera gráfica o curva de calibración.

Debido a que la espectrofotometría es principalmente una técnica colorimétrica, en este caso no puede usarse para determinar compuestos sin compararse con una sustancia o estándar de referencia, para el análisis semi-cuantitativo debe determinarse el tiempo de reacción en este caso la tira reactiva y el producto de formación, cuando este papel se diluye para remover el componente que esta semi húmedo en la tira; existe una lectura en absorbancia en su forma acuosa, y que da la señal debido a la concentración implícita en cada sistema del estándar de tiocianato el cual existió inicialmente, y de esta forma interpretar los

resultados como la proporcionalidad que existe en la formación de un compuesto y la transferencia del mismo en forma de gas (HCN) para la formación de otro producto (Isopurpurina) bajo condiciones experimentales, las cuales para que se pudieran dar, se tomaron 5ml del los sistemas 1 al 7 del estándar de tiocianato, enseguida se incubaron de 30-40°C; por lo tanto existe la probabilidad de su identificación y que su determinación sea correcta. Para el sistema 2 cuando se formó el compuesto en la tira reactiva también se determinó su longitud de onda en su forma acuosa.



#### 4.4. ELABORACIÓN DE LA TIRA REACTIVA

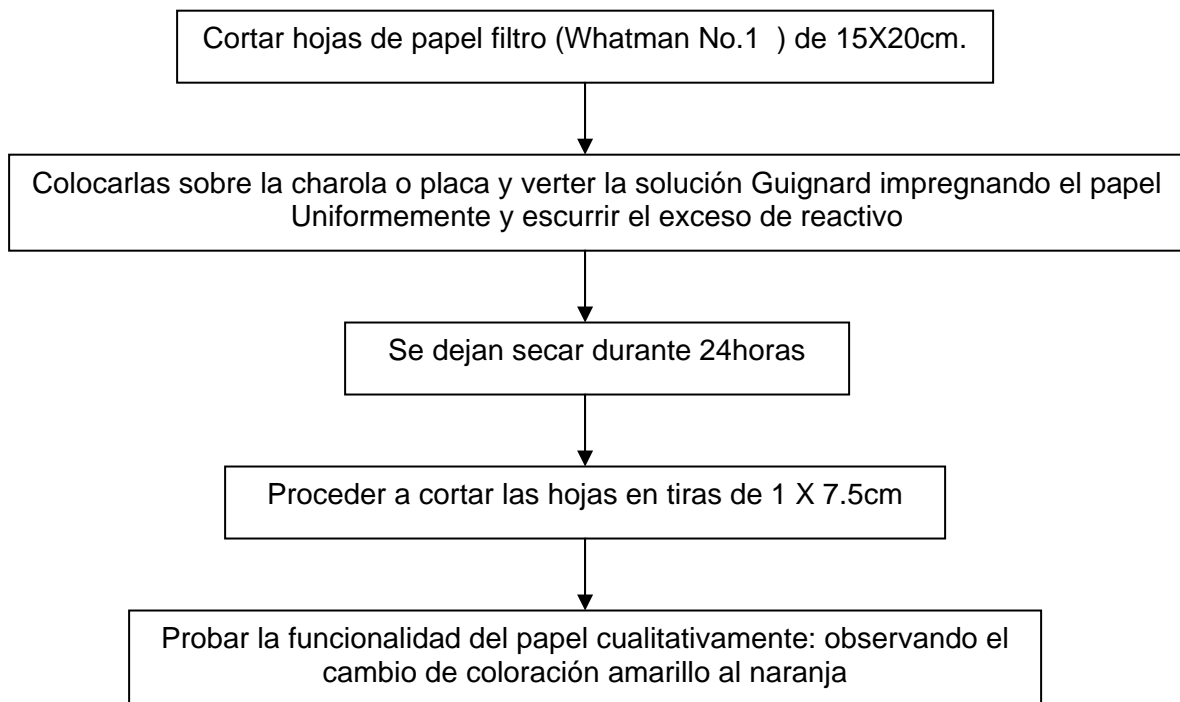
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL REACTIVO DE GUIGNARD Y LA ELABORACIÓN DE LA TIRA REACTIVA DE PAPEL CON ÁCIDO PÍCRICO.

##### **Reactivo de Guignard:**

Solución de ácido Pícrico al 1% 100ml. Y Bicarbonato de sodio al 10% 100ml.

Estas dos soluciones se mezclan al final una vez homogenizadas y preparadas.

Volumen final 200ml.

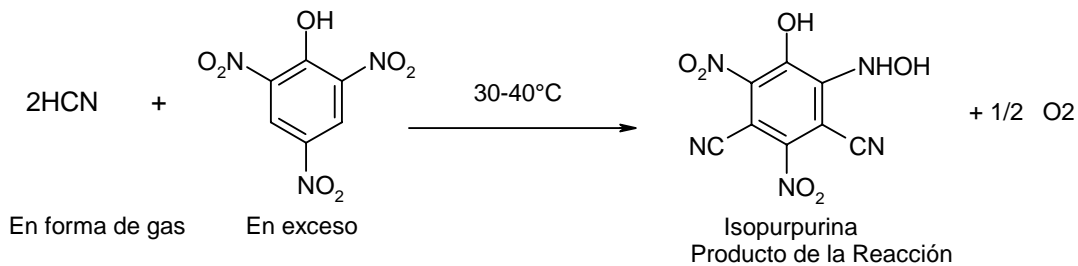


## DETERMINACIÓN ANALÍTICA CUALITATIVA

### Fundamento del método

El ácido cianhídrico (HCN) al entrar en contacto con el ácido pícrico presenta una coloración roja debida a la formación de isopurpurina, en presencia de un álcali. El color se desarrolla a una temperatura de entre 35°C y puede permanecer sin alteración durante dos meses. <sup>(17)</sup>

EL ÁCIDO CIANHÍDRICO LIBERADO POR LA REACCIÓN DEL SISTEMA REACCIONA CON UNA TIRA REACTIVA DE ÁCIDO PÍCRICO LA CUAL SE VE FAVORECIDA AL REACIONAR DE LA SIGUIENTE MANERA:



De tal forma podemos mencionar que el producto de esta reacción de liberación de ácido cianhídrico y formación del complejo colorido es el que nos va determinar indirectamente la cuantificación de tiocianato en la orina. Por lo tanto la curva de calibración es indirecta la cual se obtiene a partir de las tiras reactivas sumergidas en agua.

Basándose en métodos oficiales establecidos por la A.O.A.C. (**Association of Official Analytical Chemistry**) Prueba 49.11.01(1)2000<sup>(13)</sup>, se tiene una zona de reactividad por parte de la tira que suele ser de 1cm de ancho por 5 de largo para evitar tiempos prolongados en la formación del complejo o compuesto.

Estas tiras son dispositivos analíticos que disponen de compuestos específicos que solo van a reaccionar con los necesarios, por simple colocación de la muestra, donde se produzca una reacción en la cual conlleve a una respuesta para que pueda ser leída en un espectrofotómetro.

El tiempo de reacción es muy importante determinarlo, para saber que cantidad hay del compuesto formado en la tira reactiva, y cuanto se esta recuperando del mismo en base a los estándares.

### **Precauciones y recomendaciones.**

- Precauciones: usar cubre bocas, guantes y goggles cuando se va a cortar las tiras reactivas.
- Las tiras se cortan en la campana extractora.
- Se marca la tira reactiva dejando un espacio de 5cm. Se colocan unas pocas gotas de agua destilada en la caja petri de plástico cuando se vallan a introducir las tiras en el tubo se humedece previamente la punta de la tira con agua destilada usando como soporte la caja petri, en el momento que se va a utilizar.
- La tira reactiva no debe tocar: la muestra, ni las paredes del tubo ni mezclarse con la solución del alícuota, se cierra el tubo deteniendo la tira haciendo un dobléz con el espacio restante de la tira con el tapón y se pone a incubar a baño maría a una temperatura de 30-40°C; determinar los tiempos en los cuales se ve favorecida la reacción y al incubación.

### **Proceso de elución en la tira reactiva**

El proceso de elución esta dado por la composición de una fase móvil, que en este caso es un gas: HCN y una fase estacionaria que fue la tira reactiva. la composición variará progresivamente con la temperatura, el HCN va a ser fijado en al tira con respecto al tiempo de reacción y de incubación, para este caso se hizo pasar este gas mediante la tira reactiva, en un sistema cerrado, por ejemplo: el tubo de vidrio con tapón de rosca.

### **Modo de empleo de la tira**

- Una vez transcurrido el tiempo se destapa el tubo y se retira la tira
- La tira se introduce en 5ml de agua destilada en un vaso de precipitado, se deja durante media hora hasta que todos los componentes en elución en la tira se hallen disueltos en el agua.

Se coloca el sobrenadante o solución en un tubo de ensayo y se lee a una longitud de onda de 510nm. Esto incluye a todos los sistemas de la curva de calibración y la muestra.

### **Precauciones contra los biopeligros**

Las muestras recolectadas fueron de personas sanas a las cuales se les práctico un cuestionario previo, en el cual se les preguntó sobre sus condiciones de salud, su tipo de consumo en alimentos y sus hábitos sobre el consumo de cigarro.

Aunque los virus y las bacterias o microorganismos se pueden encontrar en fluidos biológicos, el material con el que se trabajo fue desinfectado con hipoclorito de sodio al 10%; cabe mencionar que la orina de personas con infecciones en vías urinarias e infecciones infecto contagiosas como la hepatitis no se usará en el estudio.

#### **4.5. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO ( $\lambda$ )**

En primera instancia es prioritario elegir la longitud de onda ( $\lambda$ ) para desarrollar una técnica espectrofotométrica en la cual se van a realizar las mediciones de las concentraciones tanto de los estándares como de las muestras de orina.

Cuando se desarrolla una técnica analítica por Espectrofotometría de Absorción Molecular (EAM) se debe considerar el analito en solución el cual nos va a dar la señal y el pico más alto para determinar su longitud de onda máxima así como establecer en que espectro de absorción de la luz es apropiado a trabajar, para este caso en lo particular se seleccionó la región de luz visible en un rango de 400 a 700nm.

##### **Longitud de onda para la Curva de calibración de Tiocianato.**

Para este experimento previo, primero se realizó un barrido de la solución más concentrada, la cual contenía en exceso al permanganato, el cual a su vez está contenido el estándar de tiocianato de concentración 2.5ppm, para hacer el barrido en el sistema 1 de la dilución.

Con la finalidad de saber a que longitud de onda se debe de realizar la lectura de la absorbancia en la curva de calibración se realizó el procedimiento de barrido, es decir, a cierta longitud de onda en este caso a un intervalo de longitud de onda de 450 a 580nm en el espectro de absorción de la luz visible, determinando cual es la mejor longitud de onda para poder medir las absorbancias de trabajo; en este caso 530nm es la longitud de onda óptima.

##### **Longitud de onda para la Curva de calibración de la elución de la tira reactiva.**

Basándose en el experimento donde se sitúa la dilución de concentración 30ppm de tiocianato sistema 7 y por ser la más concentrada, se seleccionó debido a que presentó cualitativamente una coloración naranja intenso en la tira.

Para este sistema 7 en la elución y el complejo formado en la tira, la longitud de onda cambia debido a las características particulares antes mencionadas para compuesto que conforma la Isopurpurina, en el espectro de absorción de la luz visible el cual se tomaron lecturas de absorbancias de este compuesto que se formó en la misma, la cual se removió con

5ml agua, considerándola como la solución más concentrada, y que comprende un intervalo de longitud de onda de: 440 a 560nm, determinando su mayor absorción en 510nm.

Con esto se asegura la calibración del equipo para realizar los trabajos posteriores y tener longitudes de onda adecuadas para el trabajo experimental en las curvas de calibración.

#### **4.6. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO.**

Una vez establecidas las condiciones para llevar a cabo la experimentación como son: las concentraciones del estándar, longitud de onda, analito a utilizar, pH de trabajo, temperatura de experimentación para incubar y tiempo de reacción. Para ello se ve implícita tanto la curva de calibración de tiocianato y la curva de calibración del compuesto formado en la tira reactiva. La determinación de tiocianato se hace mediante la misma; identificando la detección de ácido cianhídrico (HCN) con el Reactivo de Guignard que fue impregnado en el papel con ácido pícrico y bicarbonato de sodio. El papel color amarillo pasa de color naranja a color rojo ladrillo en presencia de ácido cianhídrico (HCN), esta prueba se puede cuantificar por el vapor que se desprende de el sistema el cual contiene previamente  $\text{KMnO}_4$ ;  $\text{SCN}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en primera instancia hay que oxidar el tiocianato a cianuro el cual estando en el medio ácido se va a formar como producto de la reacción al ácido cianhídrico (HCN) controlando la temperatura entre 30-40°C, en un intervalo de tiempo la cual se vea favorecida la reacción para determinar la cantidad de tiocianato que contiene la muestra mediante esta técnica.

Cabe mencionar que la técnica propuesta en los procedimientos generales de la metodología se tiene que seguir en el orden de adición de los reactivos así como también para la muestra ya que en un principio el sistema se aforaba con agua destilada y se tenía muy poca concentración de ácido sulfúrico y de esta forma los sistemas se precipitaban tomando una coloración rojiza a color café por lo tanto no era factible leer en el espectrofotómetro, por tal razón se estudió la forma de saber cual era la concentración adecuada para acidificar el sistema y la muestra principalmente.

Una vez estudiadas las condiciones óptimas de trabajo para los sistemas en los estándares de tiocianato y de las tiras reactivas, es importante mencionar que para construir la curva de calibración se deben presentar características de incremento en la coloración de la tira, para cada nivel de concentración en cada sistema, y de igual forma al obtener el sobrenadante en el cual se puede apreciar tanto visualmente como espectrofotométricamente.

##### **pH de trabajo**

Se sabe que las condiciones de amortiguamiento a las que se impone el sistema por el ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  el pH teórico es de 0.3 ya que, es un ácido fuerte y se tiene una concentración de 2M por lo tanto los compuestos que se ven involucrados en él, no se ven

alterados, además de que ayudan a favorecer reacciones posteriores; por estas razones el permanganato no va a ser precipitado bajo estas condiciones de acidez, si el pH fuera mayor a 7 el sistema se precipitara y predominara otra forma del manganeso la cual no es de interés para éste estudio.

## **Temperatura**

Para la realización de separaciones cuantitativas se puede utilizar la diferente volatilidad de los compuestos que se encuentran en un sistema.

Todo compuesto puro posee una presión de vapor la cual está en función de la temperatura e independiente de la presión exterior. Es decir que al calentar un sistema (disolución) de dos componentes miscibles que se comporte como disolución ideal, o casi ideal, la presión de vapor de cada componente aumenta con la elevación de temperatura en la misma forma que lo hace la presión de vapor de los líquidos puros. Por lo tanto, suponiendo que los dos componentes tienen diferentes presiones de vapor a la misma temperatura, variará la composición del sistema líquido-líquido si se va eliminando la fase del vapor mediante condensación la cual es favorecida para formar un complejo en la tira reactiva y en la misma sucede el fenómeno de elución, por medio de la condensación. <sup>(1)</sup>

## **Tiempo de reacción.**

El HCN se desprende y reacciona con el picrato de sodio. El desprendimiento es rápido y tiene lugar en el transcurso de unos 15 minutos. Para dar como negativo el ensayo se esperan 3 horas. <sup>(13)</sup> Para ello se necesitará saber el tiempo de reacción ya que en otros estudios refieren que se han realizado para otro tipo de muestras como en leguminosas por lo que se tomará como referencia a la formación de nuestro compuesto, en los estándares y la muestra biológica.

## **CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO.**

Para los experimentos preliminares con el analito son:

- PH
- La reacción química sea cuantitativa  $K' \gg 1$
- Velocidad de reacción
- Longitud de onda 530nm.



Para los experimentos posteriores (semicuantitativos) en la muestra biológica y el analito son:

- Funcionalidad de la tira reactiva de papel picrato: cambio de coloración de amarillo al naranja.
- Tiempo de reacción\*
- Temperatura y tiempo de incubación\* 30-40°C.
- La reacción química sea cuantitativa  $K' \gg 1$
- Longitud de onda 510nm
- Conformidad del sistema con la ley de Beer.

\* Para el tiempo de reacción y de incubación se determinó para ambos casos con ensayos de tiempo de 3 y 6 horas los cuales citaremos para su definición, en los resultados y en el análisis de resultados.

## 4.7. CONFIABILIDAD DEL SISTEMA

### Linealidad

La linealidad de un método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta medida (propiedad). <sup>(15)</sup> Este parámetro es necesario para la correcta determinación del analito para lo cual se prepara una serie de al menos siete soluciones de un estándar. Estas soluciones se preparan para leerlas en un espectrofotómetro por sextuplicado.

Con un coeficiente de determinación  $\geq 0.98$ , el cual se determina mediante una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) la regresión se determina:

$$y = mX + b$$

Donde:

**r** = Coeficiente de correlación: indica la relación entre dos variables (x, y) donde  $r \geq 0.99$ .

La no correspondencia de la recta indica problemas por efectos de la matriz y está relacionada con la exactitud del método

**r<sup>2</sup>** = coeficiente de determinación: se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, donde  $r^2 \geq 0.98$  para que éste sea confiable. Esto nos indica que los resultados son directamente proporcionales a la concentración de un intervalo determinado.

**m** = la pendiente: se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método para evaluar la correlación de los diferentes métodos. Cuando una pendiente es negativa se dice que la relación es inversamente proporcional.

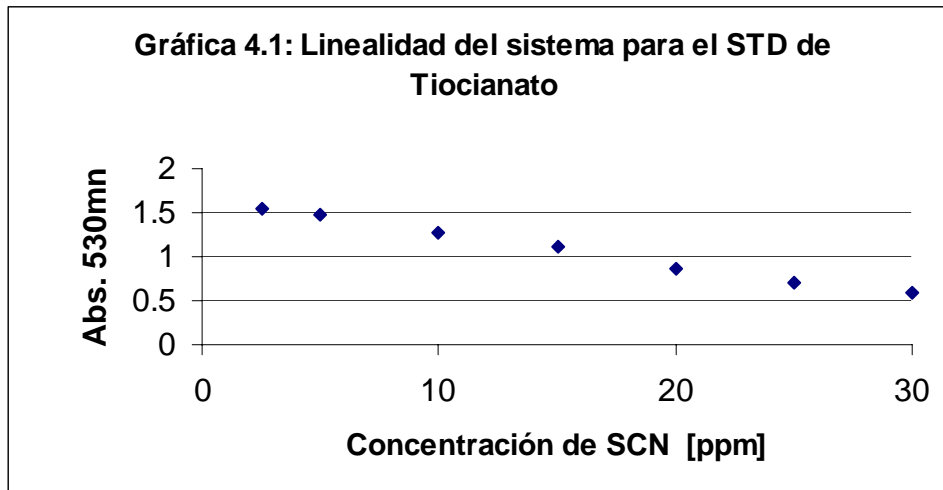
**b** = la ordenada al origen: se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio, donde **b = 0**.

En la siguiente página damos los datos de linealidad del sistema y la medición de las absorbancias, basándose en lo explicado anteriormente para los estándares de tiocianato y para el compuesto formado en la tira reactiva. Las gráficas se representan por medio de los

datos obtenidos en las absorbancias de las tiras reactivas (papel picrato) e interpolando el resultado en función de la concentración en partes por millón de tiocianato, ya que, en el caso de las tiras se emplearon los tiempos de elución de tres a seis horas de incubación a temperatura de 30-40°C; en los tres casos (4.1 a 4.3) los ensayos se realizaron para promediar seis veces en forma repetida para cada nivel de concentración.

**TABLA 4.1: Linealidad del sistema para el estándar de tiocianato**

Sistemas.	Concentración teórica ppm = $\mu\text{g/ml}$	Concentración Real ppm = $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia Promedio experimental
1	2.5	2.49	1.533
2	5	4.99	1.460
3	10	9.98	1.290
4	15	14.97	1.076
5	20	19.96	0.884
6	25	24.95	0.747
7	30	29.94	0.605



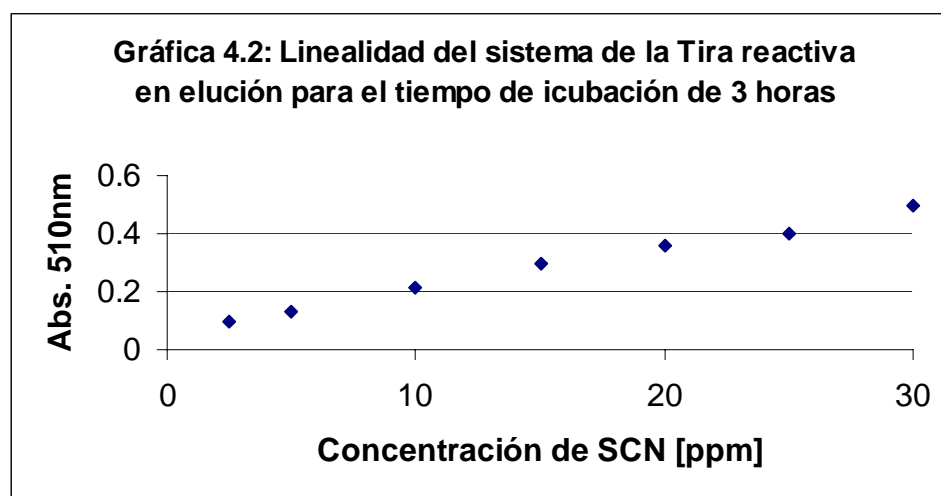
$$-m = -0.0344837$$

$$r^2 = 0.99550$$

$$B = 1.62000$$

**TABLA 4.2: Linealidad para el sistema de la tira reactiva en elución de papel picrato, tiempo de incubación de 3 Horas a temperatura de 30-40°C**

Sistemas Tiras reactivas	Concentración teórica $\mu\text{g/ml}$	Concentración Real $\text{ppm} = \mu\text{g/ml}$	Absorbancia promedio experimental
1	2.5	2.49	0.094
2	5	4.99	0.131
3	10	9.98	0.215
4	15	14.97	0.291
5	20	19.96	0.358
6	25	24.95	0.400
7	30	29.94	0.497



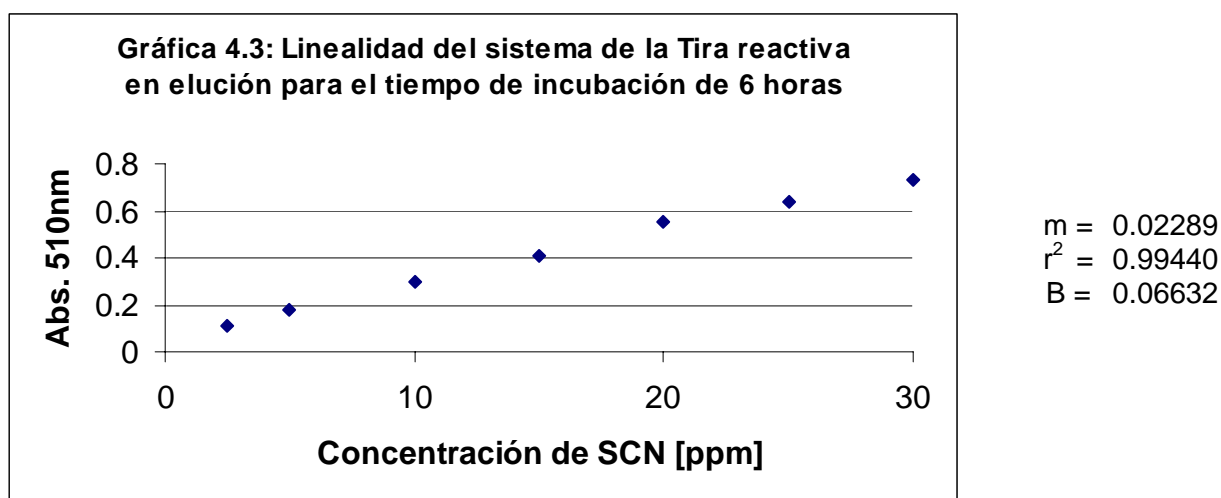
$$m = 0.014239$$

$$r^2 = 0.993675$$

$$B = 0.065042$$

**TABLA 4.3: Linealidad para el sistema de la tira reactiva en elución de papel picrato, tiempo de incubación de 6 Horas a temperatura de 30-40°C**

Sistemas Tiras reactivas	Concentración teórica $\mu\text{g/ml}$	Concentración Real $\text{ppm} = \mu\text{g/ml}$	Absorbancia promedio experimental
1	2.5	2.49	0.110
2	5	4.99	0.181
3	10	9.98	0.295
4	15	14.97	0.412
5	20	19.96	0.557
6	25	24.95	0.642
7	30	29.94	0.729



Al evaluar la linealidad ( $r^2 > 0.99$ ) se demuestra la capacidad del sistema para asegurarse que la respuesta analítica es proporcional a la concentración del analito en estudio en un intervalo de concentración, dado por los estándares y a partir de éste para formar el compuesto en la tira de papel picrato.

## **Reproducibilidad**

La reproducibilidad es el grado de concordancia de datos obtenidos (tanto de muestras como estándares) en determinaciones repetidas cuando se han introducido variaciones en condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días y diferentes laboratorios, diferentes instrumentos etc.) de esta manera se puede evaluar la reproducibilidad entre analistas, equipo, laboratorio, periodos o días, etc. Para evaluar la reproducibilidad de los sistemas se procedió a elaborar las curvas de calibración teniendo en cuenta el estudio de las concentraciones y técnicas para conformar el sistema. Las curvas de calibración por sextuplicado en diferentes días para los experimentos preeliminares y para los posteriores en diferentes días y diferentes tiempos de incubación.

Al verificar que las absorbancias concuerdan con dicha linealidad.

## **Repetibilidad**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, laboratorio etc.) y se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

## **Sensibilidad**

Este parámetro se refiere a la cualidad que tiene el método para dar un cambio en la respuesta analítica al cambiar la concentración del analito bajo las condiciones de análisis establecidas. Para lograr esto se hicieron las pruebas necesarias a fin de establecer las condiciones químicas e instrumentales para llevar a cabo las determinaciones y obtener las condiciones de trabajo. Apoyándose en lo anterior se puede apreciar que las concentraciones en las que fueron preparados los estándares para realizar las curvas de calibración (2.5 a 30ppm), el tratamiento que se le dio a los analitos propuesto en la experimentación, y la longitud de onda que se estableció a posteriori ( $\lambda = 510\text{nm}$ ) podemos decir que estas condiciones se pueden detectar y medir (sensibilidad) por el equipo usado para llevar a cabo su determinación y cuantificación indirectamente. <sup>(15)</sup>

#### 4.7. INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Existen varios métodos estadísticos para estar seguros de que un resultado obtenido experimentalmente sea confiable. La **t de Student** es un valioso auxiliar estadístico que se utiliza para medir la probabilidad. <sup>(23)</sup> Se usa para expresar intervalos de confianza para comparar los resultados de diferentes experimentos. Al obtener los resultados de la elución de las tiras y medir sus respectivas absorbancias de las muestras de orina por lo regular debe ser cercano a las absorbancias de los estándares.

Se obtuvieron diferentes muestras de personas fumadoras únicamente para evidenciar el compuesto el cual se va a fijar en la tira, enseguida se procede a realizar una t de Student y verificar si las absorbancias obtenidas caen dentro de este intervalo y poder afirmar que se logró identificar el tiocianato en la orina.

El intervalo de confianza se determina con un 95% de confianza el cual se determina con la siguiente fórmula:

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$\mu$  = Intervalo de confianza

t = es el número que se obtiene de la t de Student (tablas)\*

$\bar{X}$  = media medida

S= desviación estándar

n = número de observaciones

Con los datos de la media, desviación estándar y la t obtenida en la tabla de t de Student (ver anexo 3) se procede a sustituir estos valores en la tabla para obtener estos valores más precisos se utilizaron los valores de absorbancia y luego se interpolaron en la gráfica para obtener concentración.

Los siguientes datos de las concentraciones y absorbancias de tiocianato fueron solo para 10 muestras de fumadores, analizando las orinas de la misma forma para diferentes tiempos ya que se desea recabar información para determinar el tiempo de reacción y de incubación así como su concentración en las mismas.

**TABLA 4.4: Concentración de SCN en Fumadores a diferentes tiempos de incubación**

Absorbancias $\lambda=510\text{nm}$ a 3horas	Concentración de SCN en [ppm] a 3horas	Absorbancias $\lambda=510\text{nm}$ a 6horas	Concentración de SCN en [ppm] a 6horas
0.265	8.67	0.229	11.51
0.368	13.17	0.250	12.98
0.246	7.84	0.236	11.89
0.253	8.15	0.233	11.74
0.357	12.69	0.241	12.35
0.222	6.79	0.203	9.68
0.278	9.24	0.186	8.49
0.336	11.77	0.187	8.56
0.322	11.16	0.222	11.02
0.274	9.0	0.184	8.35

**Intervalos de confianza al 95% para la identificación de la concentración de tiocianato en orina a una temperatura de 30-40°C, en un tiempo de 3 horas.**

$$\mu = 9.848 \pm 1.8331 \left( \frac{2.19269}{\sqrt{10}} \right)$$

$$\text{LS} = 9.848 + 1.2710 = 11.11\text{ppm}$$

$$\text{LI} = 9.848 - 1.2710 = 8.57\text{ppm}$$

Por lo que el intervalo de confianza al 95% de tiocianato en partes por millón es:

**(8.57 ≤ X ≤ 11.11) interpolando para la gráfica (4.2) de 3 horas**

**Intervalos de confianza al 95% para la identificación de la concentración de tiocianato en orina a una temperatura de 30-40°C, en un tiempo de 6 horas.**

$$\mu = 10.662 \pm 1.8331 \left( \frac{1.74151}{\sqrt{10}} \right)$$

$$\text{LS} = 10.662 + 1.2710 = 11.67\text{ppm}$$

$$\text{LI} = 10.662 - 1.2710 = 9.65\text{ppm}$$

Por lo que el intervalo de confianza al 95% de tiocianato en partes por millón es:

**(11.67 ≤ X ≤ 9.65) interpolando para la gráfica (4.3) de 6 horas**



## *5. RESULTADOS*

## 5.0. RESULTADOS EXPERIMENTALES

**Tabla 5.1: Absorbancias promedio obtenidas en los estándares de tiocianato**

SISTEMAS	Concentración Teórica [ppm]	Concentración Experimental. [ppm]	Promedio de absorbancias	C.V. %
1	2.5	2.49	1.533	C.V.=1.66
2	5	4.99	1.460	C.V.=1.39
3	10	9.98	1.290	C.V.=1.43
4	15	14.97	1.076	C.V.=3.41
5	20	19.96	0.884	C.V.=3.21

**Tabla 5.2: Absorbancias promedio obtenidas a partir de los estándares de tiocianato en la tira reactiva en un tiempo de elución de 3 horas a una temperatura de 30-40°C**

SISTEMAS	Concentración Teórica [ppm]	Concentración Experimental. [ppm]	Promedio de absorbancias	C.V. %
1	2.5	2.49	<b>0.091</b>	1.91
2	5	4.99	<b>0.110</b>	2.66
3	10	9.98	<b>0.217</b>	1.15
4	15	14.97	<b>0.289</b>	2.32
5	20	19.96	<b>0.356</b>	1.19

**Tabla 5.3: Absorbancias promedio obtenidas a partir de los estándares de tiocianato en la tira reactiva en un tiempo de elución de 6 horas a una temperatura de 30-40°C**

SISTEMAS	Concentración Teórica [ppm]	Concentración Experimental. [ppm]	Promedio de absorbancias	C.V. %
1	2.5	2.49	<b>0.113</b>	2.76
2	5	4.99	<b>0.188</b>	3.46
3	10	9.98	<b>0.296</b>	2.08
4	15	14.97	<b>0.404</b>	2.00
5	20	19.96	<b>0.518</b>	2.52

Los resultados experimentales de las tablas 5.1 a 5.3 para el cálculo de los promedios de las absorbancias y su coeficiente de variación (C.V.) respectivos en cada nivel de concentración, se pueden consultar en el (anexo 6).

En las siguientes tablas se muestra la comparación en la elección de un sistema de [20ppm] de tiocianato e interpolando el resultado de las absorbancias de las tiras en elución en tiempos de incubación de 3 y 6 horas con un número de ensayos de 6 veces cada sistema.

**Tabla 5.4: Comparación de concentraciones del sistema 5, para un STD. de tiocianato**

Sistema 5		Sistema 5	
Número de ensayos	Concentración[20ppm] de tiocianato y elución de la tira a 3 horas	Número de ensayos	Concentración[20ppm] de tiocianato y elución de la tira a 6 horas
1	19.15	7	20.66
2	19.68	8	19.30
3	19.28	9	19.02
4	19.68	10	20.01
5	19.81	11	20.09
6	19.68	12	19.09
Promedio	$\bar{X} = 19.56$	Promedio	$\bar{X} = 19.69$
Desviación estándar	S = 0.28280	Desviación estándar	S = 0.65789

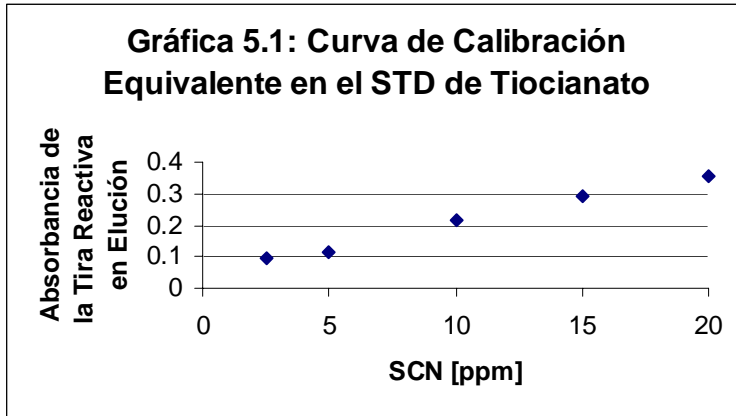
**Tabla 5.5: Concentración de tiocianato en [ppm] para 10 muestras de orina**

Número de ensayos	Concentración[SCN] en 10 muestras de orina y la elución tira reactiva 3horas	Número de ensayos	Concentración[SCN] en 10 muestras de orina y la elución tira reactiva 6horas
1	8.67	11	11.51
2	13.17	12	12.98
3	7.84	13	11.89
4	8.15	14	11.79
5	12.69	15	12.35
6	6.79	16	9.68
7	9.24	17	8.49
8	11.77	18	8.56
9	11.16	19	11.02
10	9.0	20	8.35
Promedio	$\bar{X} = 9.848$	Promedio	$\bar{X} = 10.662$
Desviación estándar	$S = 2.19269$	Desviación estándar	$S = 1.74151$

El número de ensayos es de 10 veces empleando las mismas muestras de orina por separado en diferentes tiempos de incubación y de reacción junto con la tira en elución.

## Cuantificación de tiocianato en las muestras de orina.

A continuación se muestran las siguientes tablas y gráficas con los resultados para cada experimento, y la elaboración de las curvas de calibración de la solución acuosa que formó al compuesto mediante la elución en la tira de papel picrato, junto con muestras de orina analizadas en diferentes días, bajo condiciones de análisis.



$$m = 0.01573$$

$$r^2 = 0.99182$$

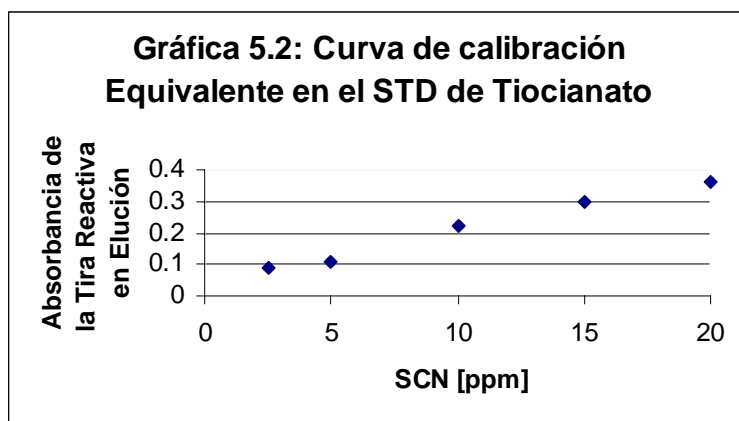
$$B = 0.04859$$

**Tabla 5.6: Experiencia 1. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato**

Sistemas.	concentración teórica ppm = $\mu\text{g/ml}$	concentración Real ppm = $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia experimental
1	2.5	2.508	0.094
2	5	5.018	0.112
3	10	10.036	0.216
4	15	15.054	0.289
5	20	20.072	0.358

**Tabla 5.7: Experiencia 1. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato**

Sistemas Tiras reactivas Muestras de orina	Absorbancia experimental	Concentración de Tiocianato ppm = [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	0.128	5.33
2	0.133	5.64
3	0.144	6.32
4	0.134	5.70
5	0.185	8.87

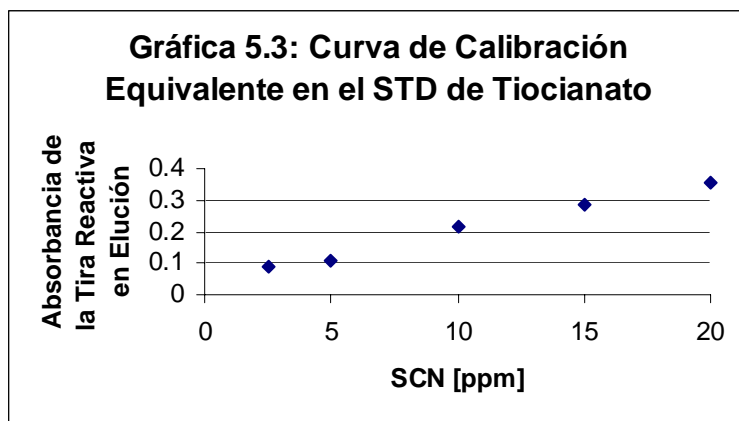


**Tabla 5.8: Experiencia 2. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato**

Sistemas.	Concentración teórica ppm = $\mu\text{g/ml}$	Concentración Experimental ppm = $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia experimental
1	2.5	2.508	0.090
2	5	5.018	0.111
3	10	10.036	0.222
4	15	15.054	0.299
5	20	20.072	0.360

**Tabla 5.9: Experiencia 2. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato**

Sistemas Tiras reactivas Muestras de orina	Absorbancia experimental	Concentración de Tiocianato ppm = [ $\mu\text{g/mL}$ ]
6	0.130	5.45
7	0.122	4.96
8	0.152	6.82
9	0.134	5.70
10	0.215	10.70

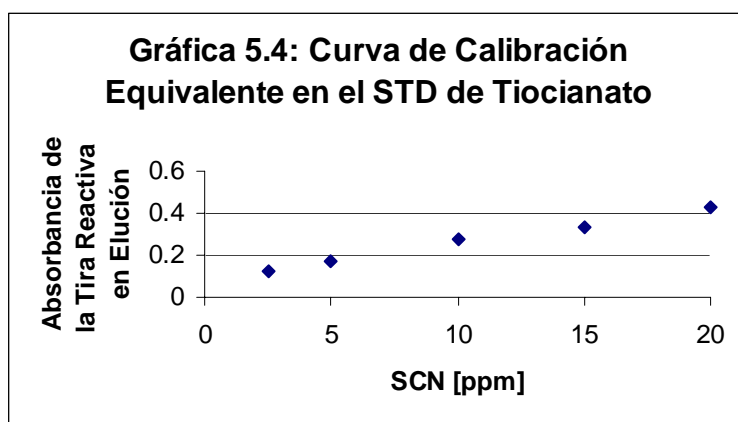


**Tabla 5.10: Experiencia 3. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato**

Sistemas.	Concentración teórica ppm = $\mu\text{g/ml}$	Concentración Experimental ppm = $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia experimental
1	2.5	2.508	0.088
2	5	5.018	0.106
3	10	10.036	0.216
4	15	15.054	0.288
5	20	20.072	0.358

**Tabla 5.11: Experiencia 3. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato**

Sistemas Tiras reactivas Muestras de orina	Absorbancia experimental	Concentración de Tiocianato ppm = [µg/mL]
11	0.143	6.26
12	0.167	7.75
13	0.135	5.76
14	0.124	5.08
15	0.141	6.14



**Tabla 5.12: Experiencia 4. Estándares del compuesto formado en la tira (isopurpurina) a partir del STD de Tiocianato**

Sistemas STD de Tiocianato	Concentración teórica ppm = µg/ml	Concentración Experimental ppm = µg/ml	Absorbancia experimental Tira reactiva Eluida
1	2.5	2.508	0.122
2	5	5.018	0.172
3	10	10.036	0.274
4	15	15.054	0.358
5	20	20.072	0.424



**Tabla 5.13: Experiencia 4. Compuesto formado en la tira reactiva (isopurpurina) a partir de la muestra biológica y su resultado interpolado en concentración de tiocianato**

Sistemas Tiras reactivas Muestras de orina	Absorbancia experimental	Concentración de Tiocianato ppm = [µg/mL]
16	0.190	9.18
17	0.170	7.94
18	0.220	11.04
19	0.169	7.88
20	0.140	6.07

El tiempo de incubación para las tiras en elución junto con las muestras de orina, en las experiencias de la 1 a 4 esta definido en 3 horas de las cuales citaremos mas adelante en el análisis de resultados y conclusiones.

**Tabla 5.14: Muestras de orina de personas no fumadoras**

Muestra No.	ABSORBANCIA
1	0.084
2	0.081
3	0.072
4	0.091
5	0.062
6	0.070
7	0.079
8	0.078
9	0.089
10	0.085

Para éste caso solo se determinó la lectura del las absorbancias para reportar como negativo la presencia de tiocianato.

**Intervalos de confianza al 95% para la identificación de la absorbancia en orina de personas no fumadoras a una temperatura de 30-40°C. En un tiempo de 3 horas.**

$$\mu = 0.0791 \pm 1.8331 \left( \frac{0.00899938}{\sqrt{10}} \right)$$

$$LS = 0.0791 + 0.0052167362 = 0.084$$

$$LI = 0.0791 - 0.0052167362 = \mathbf{0.073}$$

Por lo que el intervalo de confianza al 95% de la absorbancia es:

$$\mathbf{(0.073 \leq X \leq 0.084) \text{ de 3 horas}}$$

Con estos datos se calculará el límite de detección de tiocianato en los estándares y analitos en la curva de calibración (ver página 67).

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### **Comportamiento de la tira reactiva con disoluciones de tiocianato en cada sistema y la muestra biológica.**

Los resultados obtenidos de las siete disoluciones en este análisis nos muestran que tanto la zona de elución de la tira, como la zona donde se depositaron los 5ml de la alícuota de tiocianato de concentración de 2.5 a 30ppm en el mismo tubo cerrado; las tiras reactivas mantienen el mismo cambio cromático en los siete sistemas al ser analizadas cada una individualmente por sextuplicado cuando los experimentos se realizaron al evaluar la linealidad del sistema en forma repetida, lo que permite afirmar que la determinación de tiocianato está influida por la concentración de HCN cuando es fijado por el ácido pícrico que fue impregnado en la tira de papel. Este aspecto, es muy importante para el uso de la tira reactiva tanto en los analitos como en las muestras biológicas.

En el caso de las 5 disoluciones el cambio cromático que se produce en la zona de reactividad de las tiras de papel picrato, cuando estas se introdujeron en los tubos de vidrio; es claramente observable para los 5 sistemas en los cuales estaban contenidos los analitos de concentración de tiocianato de 2.5 a 20ppm inicialmente, por lo que esto brinda una información cualitativa y funcional en las tiras reactivas. En la parte cuantitativa al ser leídas las soluciones en el equipo de las tiras en elución para cada nivel de concentración de los cinco sistemas, se muestran en la tabla 5.2 y 5.3, los resultados en el aumento de las absorbancias de forma proporcional. También presentan un cambio de color definido a estas concentraciones en los 5ml de la solución del compuesto removido de las tiras, lo que corresponde con el comportamiento deseado para cada nivel de concentración.

El trabajo con los analitos y las muestras de orina se efectuó con la tiras reactivas y con los métodos analíticos descritos, con vistas a precisar la concordancia de ambos resultados, los cuales se muestran en las tablas de las experiencias 1 a 4. El total de muestras analizadas fue de: 20 y el rango de concentración de tiocianato que se determinó por este método en esta población es de: 2.5 a 11µg/mL. En la mayor parte de los analitos junto con las muestras biológicas analizadas, los valores y concentración de tiocianato por la tira, corresponden con el de las determinaciones cuantitativas realizadas junto con la curva de calibración propuesta.

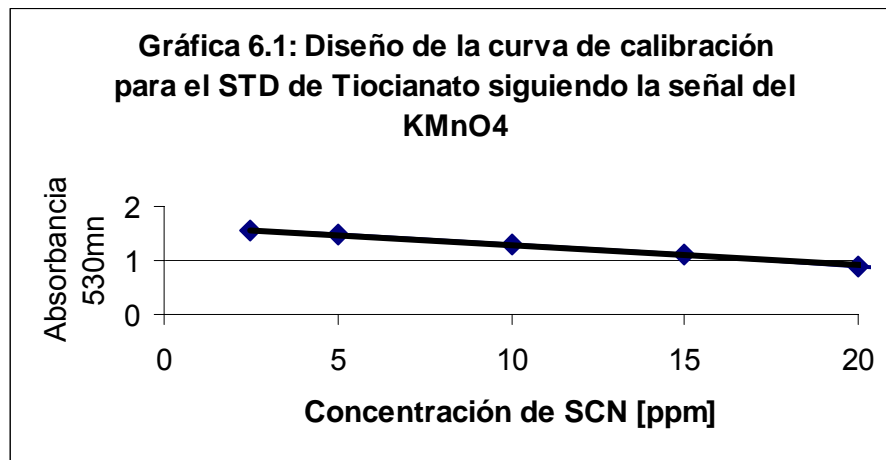
La determinación de tiocianato utilizando la tira reactiva no está influida por los componentes que no sean tiocianato presentes en la muestra de orina ya que, la prueba es específica para formar HCN.

Las tiras reactivas mantienen un comportamiento cromático estable hasta 2 semanas cuando se forma la isopurpurina sobre las tiras; y para la solución removida o cromógeno, en las mismas es estable durante 7 días.

Las tiras después de elaborarlas se llevan a refrigeración de ahí que su conservación sea la más conveniente; si no se cuenta para refrigerarlas se mantienen a T. A. durante 15 días para que estas puedan ser utilizadas.

### Cuantificación indirecta de tiocianato

Para evaluar la cuantificación indirecta de tiocianato mediante la formación de ácido cianhídrico se comparan los resultados de las tablas 5.1 y 5.2 graficando los resultados promedio de las absorbancias experimentales para cada nivel de concentración de los estándares tiocianato.

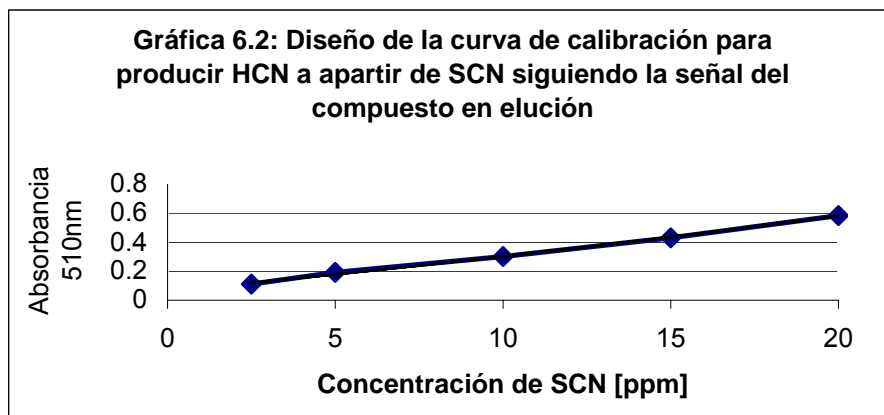


Para la primera gráfica 6.1, podemos decir que la propiedad que esta dada por la señal que da el permanganato en exceso, y considerándola como el primer orden de reacción en la cual se obtiene una pendiente negativa. Se tiene como resultado la presencia de cianuro en los productos de la reacción y que a su vez la lectura de las absorbancias es de forma descendente.



La primera reacción de la ecuación (1) en los sistemas iniciales, demuestran que el sistema sigue una señal de tipo lineal e inversamente proporcional a la concentración de tiocianato además de cumplir con las características de una curva de calibración indirecta.

La separación de la especie química que en este caso es el tiocianato en ión cianuro y que para transformarlo a ácido cianhídrico se puede aprovechar a partir de la acidez del medio donde se ve involucrado el ácido sulfúrico, al incubar a temperatura de 30-40°C para favorecer la reacción y generar el HCN que se señala en la ecuación (2).



Para la gráfica 6.2, podemos mencionar que también existe la evidencia en la formación de la Isopurpurina proporcionalmente fijando al HCN mediante la tira de papel picrato, cuando se someten estos sistemas a hidrólisis ácida e imponiéndolo a la temperatura experimental (30-40°C) se forma el HCN, además de existir mayor concentración de tiocianato de 2.5 a 20ppm al graficar los resultados de absorbancia. Se demuestra que la relación es directamente proporcional al formar isopurpurina y al existir HCN a partir del tiocianato presente en los sistemas.

Al enjuagar y escurrir de la tira reactiva en elución en los 5ml de agua destilada, la solución que se obtuvo se llevó a leer en el espectrofotómetro y se graficó su absorbancia con los datos de concentración del estándar de tiocianato, es así como se obtiene la segunda curva de calibración. El compuesto que se formó en la tira reactiva, presenta un aumento de las

absorbancias con una pendiente positiva en la gráfica 6.2, respectivamente para cada nivel de concentración de 2.5 a 20 ppm de tiocianato, a intervalos de tiempo establecidos de 3 y 6 horas.



Sin embargo, se demuestra que la segunda ecuación la señal se puede leer cuando el HCN liberado de cada sistema es fijado por el ácido pícrico de la tira para formar este último producto de la reacción el cual es la isopurpurina.

La linealidad para ambas gráficas 6.1 y 6.2, demuestra que la formación de los reactivos y productos, en el caso de la primera y segunda ecuación los compuestos se encuentran presentes en proporción o en cantidad añadida y en condiciones de incubación. por lo tanto, las condiciones de reacción son las adecuadas para conformar el último producto de la reacción de formación que es en este caso la isopurpurina y así tomar la decisión de cuantificarlo indirectamente en la orina y en los estándares en base a esta relación estequiométrica.

A continuación se ilustra una tabla de equivalencias de tiocianato (SCN) vs ácido cianhídrico (HCN) y del por qué, se considero graficar las absorbancias de la elución en las tiras reactivas al ser removido éste compuesto de la mismas y obtener su forma acuosa junto con los datos iniciales de las concentraciones de los estándares de tiocianato.

**Tabla 6.1: tabla de concentraciones equivalentes de SCN y HCN**

Concentración de SCN [ppm]	Concentración [M] SCN	Concentración de HCN [ppm]
2.5	0.000025	0.67525
5	0.00005	1.3505
10	0.0001	2.7010
15	0.00015	4.0515
20	0.00020	5.462

$$\frac{0.000025 \text{ mmol SCN}}{\text{mL}} \left( \frac{1 \text{ mmol HCN}}{1 \text{ mmol SCN}} \right) \left( \frac{27.01 \text{ mg HCN}}{1 \text{ mmol HCN}} \right) \left( \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 0.67525 \text{ ppm HCN}$$

Existe una relación estequiométrica de SCN<sup>-</sup> a partir de éste y su transformación a HCN y la formación de isopurpurina en forma proporcional.

### Tiempo de reacción y de incubación

En el tiempo de reacción se necesitó saber cuantas horas eran las necesarias para llevar a cabo la formación del compuesto en la tira reactiva, se sabe que el ácido pícrico como sal en un medio básico generado por el bicarbonato de sodio reacciona con el HCN que se libera por el proceso de hidrólisis ácida estimulado por la temperatura, esta reacción se pone de manifiesto cuando se genera un cromógeno naranja a rojo en la tira reactiva, el cual es debido a la formación isopurpurina, en presencia de un álcali lo cual se pudo observar la reacción en función de la intensidad del color generado por la concentración de HCN con la cual se calcula semi cuantitativamente la concentración de tiocianato de forma indirecta en un tiempo de tres a seis horas.

Para evaluar el tiempo de incubación y de reacción se llevó a cabo un análisis estadístico para saber si las concentraciones variaban a diferentes tiempos, este análisis es una Prueba de Hipótesis, para la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones. <sup>(23)</sup> Para este caso se calcularon las medias y la desviaciones estándar de las tablas 5.4 y 5.5 (ver página 48, 49).

Para los datos de la tabla 5.4 se desea saber si la concentración de tiocianato es la misma o aumenta con respecto al tiempo de tres a seis horas.

La media y la varianza para los dos tiempos son:

$$3h \quad X_1 = 19.56 \quad S_1^2 = 0.0799758$$

$$6h \quad X_2 = 19.695 \quad S_2^2 = 0.432700$$

La hipótesis nula adoptada, es el tiempo de incubación y de reacción de los cuales no influye la variación de la concentración de tiocianato.

Se calcula **t** en la siguiente ecuación:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

**Sustituyendo:**

$$t = \frac{19.56 - 19.695}{\sqrt{\frac{0.0799758}{6} + \frac{0.432700}{6}}} = -0.461836$$

Hay 10 grados de libertad, de manera que el valor crítico de **t** es de:  $\pm 1.8125$  ( $p=0.05$ ).

El valor observado de **t** calculada es menor que el valor crítico, por lo tanto se acepta la hipótesis nula; no hay pruebas de que el tiempo de incubación y de reacción afecte la tasa de concentración de tiocianato en el estándar.

En el experimento con las muestras de orina se llevó a cabo de la misma forma en el cálculo con respecto al tiempo de incubación y de reacción.

Para los datos de la tabla 5.5 se desea saber si la concentración de Tiocianato en orina aumenta con respecto al tiempo de tres a seis horas.

La media y la varianza para los dos tiempos son:

$$3h \quad X_1 = 9.848 \quad S_1^2 = 4.8079$$

$$6h \quad X_2 = 10.662 \quad S_2^2 = 3.03286$$

La hipótesis nula adoptada, es el tiempo de incubación y de reacción de los cuales no influye la variación de la concentración de Tiocianato



Se calcula **t** en la siguiente ecuación:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

**Sustituyendo:**

$$t = \frac{9.848 - 10.662}{\sqrt{\frac{4.8079}{10} + \frac{3.03286}{10}}} = -0.9192$$

Hay 18 grados de libertad, de manera que el valor crítico de **t** es de: **±1.7341** ( $p=0.05$ ).

El valor observado de **t** calculada es menor que el valor crítico, por lo tanto se acepta la hipótesis nula; no hay pruebas de que el tiempo de incubación y de reacción afecte la tasa de concentración de tiocianato en las muestras de orina.

### **Recuperación de tiocianato formado en la tira**

Podemos decir que tenemos una recuperación de tiocianato de forma indirecta cuantitativa y cualitativamente ya que, la tira mostró siempre los cambios de coloración del amarillo al naranja como se especificó en el fundamento de la prueba de Guignard (papel de picrato de sodio).

Apoyándose en lo anterior podemos hacer una relación de SCN y HCN en la formación de Isopurpurina en la tira de papel picrato, calculando el promedio de las absorbancias de las tablas 5.2 para tres horas y 5.3 para seis horas y así comparar la eficiencia en el porcentaje de recuperación a partir de resultado promedio experimental de absorbancias de las cuales corresponde seis ensayos promedio y para un solo ensayo.

Analizando de esta forma una absorbancia promedio experimental contra un solo ensayo, para cada nivel de concentración en ambos tiempos de incubación 3 y 6 horas, de esta forma se comparan ciertos porcentajes de recuperación de los estándares de tiocianato, de los cuales mediante la elución del compuesto formado (Isopurpurina).

Cabe aclarar que se estableció como 100% el promedio experimental de absorbancias el cual recabo mas información precisa en un número de 6 ensayos, que corresponden a cada nivel de concentración, y de la manera siguiente hacer la relación del cálculo del porcentaje del compuesto formado en la tira de papel picrato, con respecto al que se formó en un solo ensayo y que también corresponde para cada nivel de concentración.

El cálculo de la relación para obtener el por ciento de recuperación de forma indirecta; es el ejemplo que se cita de la manera siguiente:

Para un mismo nivel de concentración equivalente a 2.5ppm.

$$\begin{array}{r} 0.091\text{abs promedio} \text{ -----}100\% \\ 0.090 \text{ abs experimental} \text{ -----} X \\ X = 98.90 \% \end{array}$$

98.90% es el porcentaje que se formó de Isopurpurina el cual fijo al HCN, esta relacionado en proporción de SCN y la absorbancia medida de la elución de la tira sumergida en los 5ml de agua.

**En seguida se presenta el cálculo para los Porcentajes de recuperación de SCN con respecto a la formación de HCN en un tiempo de elución de 3 y 6 horas en la tira de papel picrato y su compuesto removido en 5ml de agua en las siguientes tablas:**

**Tabla 6.2: Cálculo del porcentaje % en absorbancias promedio vs un solo ensayo.**

Sistemas Tiras reactivas	Absorbancia promedio Experimental 3horas	Absorbancia Experimental <b>3horas</b>	Porcentaje de formación en la tira %
1	<b>0.091</b>	0.090	<b>98.90</b>
2	<b>0.110</b>	0.106	<b>96.36</b>
3	<b>0.217</b>	0.196	<b>90.32</b>
4	<b>0.289</b>	0.278	<b>96.19</b>
5	<b>0.356</b>	0.352	<b>98.87</b>

**Tabla 6.3: Cálculo del porcentaje % en absorbancias promedio vs un solo ensayo.**

Sistemas Tiras reactivas	Absorbancia promedio Experimental 6horas	Absorbancia Experimental <b>6horas</b>	Porcentaje de formación en la tira %
1	<b>0.113</b>	0.111	<b>98.23</b>
2	<b>0.188</b>	0.181	<b>96.27</b>
3	<b>0.296</b>	0.279	<b>94.25</b>
4	<b>0.404</b>	0.403	<b>99.75</b>
5	<b>0.518</b>	0.474	<b>91.50</b>

Para ambos casos el porcentaje de recuperación mediante la tira reactiva esta entre 90.32 y 99.75% esto nos confirma que la formación de ácido cianhídrico es proporcional a la concentración inicial de tiocianato la cual evalúa la eficiencia por parte de la tira reactiva y en la solución. Reiterando que ambos tiempos son adecuados para la determinación de tiocianato en las muestras de orina y así establecer un tiempo promedio de tres horas.

#### **Análisis de linealidad.**

LINEALIDAD DEL SISTEMA: Se determinó construyendo una curva de calibración de la misma solución patrón (Tiocianato de potasio en concentración conocida), se analizaron en un principio 7 niveles de concentración hasta 30ppm, con un número de ensayos de seis veces en diferentes días. Para determinar la linealidad de los sistemas se comparó los resultados de las absorbancias y se estableció, considerar cinco puntos para graficar; puntos mínimos que requiere una curva de calibración para métodos analíticos; en los cuales se analizaron 5 niveles de concentración (2.5; 5; 10; 15; 20  $\mu\text{g/mL}$ ) en un número de ensayos de seis veces en diferentes días. Cabe mencionar que esta curva de calibración se construyó a partir de los datos teóricos de los valores de referencia que reportaba la literatura para concentraciones de tiocianato en orina y de la cual se pudo constatar cuando se obtuvieron resultados experimentales de concentración y los intervalos de confianza en las muestras de orina.

A continuación se presentan los resultados del promedio para evaluar la linealidad del sistema. Para resumir la explicación en esta tabla se le asignó las letras: **A** para siete niveles de concentración y **B** para cinco niveles de concentración.

**Tabla 6.4: Parámetros estadísticos para determinar la linealidad del sistema.**

<b>A</b> STD [SCN] 30ppm	<b>A1</b> Tira reactiva. Tiempo 3h 7 niveles de concentración	<b>A2</b> Tira reactiva Tiempo 6h 7 niveles de concentración	<b>B</b> STD [SCN] 20ppm	<b>*B1</b> Tira reactiva. Tiempo 3h 5 niveles de concentración	<b>B2</b> Tira reactiva. Tiempo 6h 5 niveles de concentración
-m = -0.3448	m = 0.01423	m = 0.02289	-m = -0.3656	m = 0.02498	m = 0.02273
r <sup>2</sup> = 0.9955	r <sup>2</sup> = 0.99367	r <sup>2</sup> = 0.99440	r <sup>2</sup> = 0.9966	r <sup>2</sup> = 0.99385	r <sup>2</sup> = 0.99827
b = 1.6200	<b>b = 0.06504</b>	b = 0.06632	b = 1.6441	<b>b = 0.08729</b>	m = 0.06554

Los valores de  $r^2$  para todos los casos no existe pérdida de linealidad por lo cual indica una relación significativa entre las concentraciones y sus respectivas absorbancias, dicha relación (absorbancia concentración) se aproxima a una función del tipo  $y = mx + b$ .

Los datos mostrados siguen una relación lineal e inversamente proporcional del tipo:

$y = -mx + b$  en el intervalo de concentraciones trabajadas ya que la pendiente para caso **A** = -0.3448 y **B** = -0.3656 y la ordenada al origen es igual a 1.6 para ambos casos.

Para los casos **A1**, **A2** y **B2** la relación lineal es de tipo  $y = mx + b$  en el intervalo de concentraciones trabajadas, la ordenada al origen es igual a 0.0656; sin embargo para **\*B1** fue de **0.087**, la cual tiene mucho interés en este estudio, para poder definir el límite de detección en la curva de calibración.

## REPETIBILIDAD

Para evaluar la repetibilidad del método se emplearon los datos de absorbancias promedio de las tablas 5.1 a 5.3, en los diferentes niveles de concentración por lo tanto; queda establecida con el coeficiente de variación el cual debe ser menor del 5%.

## REPRODUCIBILIDAD

Se efectuó trabajando en un principio 7 concentraciones y después 5, el análisis para cada nivel de concentración el cual fue por sextuplicado en ambos casos. el ensayo también se realizó con la adición del estándar a cada sistema.

Demostrando estadísticamente que no existe variabilidad al graficar los datos de las absorbancias promedio en las tiras en elución, y la respectiva concentración de los estándares de tiocianato.

## SENSIBILIDAD

La sensibilidad de este método se enlaza con la pendiente de la curva de calibración y siempre que sea una representación lineal.

Puede ser medida en cualquier punto de ella, la cual esta dada por el tratamiento matemático que es, normalmente un calculo de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, donde los resultados se representan graficando respuesta vs Concentración. <sup>(11,20)</sup>

Para ello se obtuvieron datos como las absorbancias medidas a diferentes tiempos de las cuales se apreciaba que el aumento de absorbancia de 3horas con respecto de 6horas, se tenía la impresión de la formación de más compuestos, sin embargo, al interpolar los resultados de respectivas curvas de calibración y de las muestras de orina para ambos tiempos, no presentaron variación de la concentración en los promedios, como en los caso de la tablas 4.4; 5.4; 5.5 y al obtener los intervalos de confianza se confirmó que no existió variabilidad de forma significativa, de la cual pusiera en duda la interpolación de dicho resultado.

## LIMITE DE DETECCIÓN (LDD)

Es la menor concentración de analito que puede ser determinada, pero no necesariamente cuantificada en una muestra, en condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.).<sup>(15)</sup>

A continuación se llevó a cabo el análisis estadístico para evaluar el límite de detección para la elución de las tiras reactivas en sus absorbancias para el tiempo de incubación y de reacción de tres horas en los casos **A1** y **B1**.

Para ello se tomaron como dato las absorbancias en el límite inferior del intervalo de confianza de las muestras de orina de personas no fumadoras tabla 5.14, y se procedió a hacer el cálculo estadístico, agregando este dato a la curva estándar de calibración, de la siguiente manera:

**Tabla 6.5: Cálculo de Estimación para determinar el LDD para el caso B1**

ppm	Abs. $y_i$	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
<b>0</b>	<b>0.073</b>	<b>0.081</b>	0.000064
2.49	0.112	0.124	0.000144
4.99	0.172	0.168	0.00000016
9.98	0.274	0.255	0.000361
14.97	0.338	0.342	0.000016
19.96	0.424	0.430	0.000036
			$\Sigma = 0.00062116$

$$r^2 = 0.994658 \quad \mathbf{b} = \mathbf{0.0812267} \quad m = 0.0174773$$

Empleando la fórmula para obtener la desviación estándar de este resultado.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

**Sustituyendo:**

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{0.00062116}{4}} = 0.01246154$$

Por lo tanto el límite de detección (LDD) = b + (3 X S<sub>x/y</sub> calculada)

La señal en la absorbancia en el límite es de:

$$\text{LDD} = 0.0812267 + (3 \times 0.01246154) = 0.118$$

Y el límite de detección, calculado de la pendiente y ordenada al origen de la recta de regresión es de 2.10 µg/ml para el caso **B1**.

**Tabla 6.6: Cálculo de Estimación para determinar el LDD para el caso A1**

Ppm	Abs. y <sub>i</sub>	ŷ <sub>i</sub>	(y <sub>i</sub> -ŷ <sub>i</sub> ) <sup>2</sup>
<b>0</b>	<b>0.073</b>	<b>0.067</b>	0.000036
2.49	0.094	0.102	0.000064
4.99	0.131	0.138	0.000049
9.98	0.215	0.208	0.000144
14.97	0.291	0.279	0.000064
19.96	0.358	0.350	0.0004
24.95	0.400	0.420	0.000036
29.94	0.497	0.491	
			Σ = 0.000842

$$r^2 = 0.99490 \quad \mathbf{b} = 0.067774966 \quad m = 0.014138704$$

Empleando la formula para obtener la desviación estándar de este resultado

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

**Sustituyendo:**

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{0.000842}{6}} = 0.011846237$$

Por lo tanto el límite de detección (LDD) = b + (3 X S<sub>x/y</sub> calculada)

La señal en la absorbancia en el límite es de:

$$\text{LDD} = \mathbf{0.067774966} + (3 \times 0.011846237) = 0.103$$

Y el límite de detección, calculado de la pendiente y ordenada al origen de la recta de regresión es de 2.49 µg/ml. en el caso **A1**.

La ordenada al origen y la  $\hat{y}$  ponderada experimental nos indica que tanto se aproxima el valor real para el límite de detección para los casos **A1** y **B1** y así determinar la concentración en este límite; los resultados son congruentes al analizar estas dos variables:(b;  $\hat{y}$ ).



CUANTIFICACIÓN INDIRECTA DE LA CONCENTRACIÓN DE TIOCIANATO EN LAS MUESTRAS DE ORINA PARA FUMADORES Y NO FUMADORES INTERPOLANDO EL RESULTADO DE ABSORBANCIA EN LAS EXPERIENCIAS 1, 2, 3, 4.

**Tabla 6.7. Valores de absorbancia y concentración de tiocianato en orina de individuos fumadores y los no fumadores.**

Muestra No.	Absorbancias	Concentración de SCN. [ppm]	Número de cigarrillos que consume por día.	Consumo de leguminosas.
1	0.128	5.33	3	A veces
2	0.133	5.64	3-4	Siempre
3	0.144	6.32	7-9	Siempre
4	0.134	5.70	3-6	Siempre
5	0.185	8.87	10-18	Siempre
6	0.130	5.45	0	Siempre
7	0.122	4.96	0	A veces
8	0.152	6.82	2-8	Casi siempre
9	0.134	5.70	0	A veces
10	0.215	10.7	10-25	De vez en C.
11	0.143	6.26	10	Casi siempre
12	0.167	7.75	10-15	Casi siempre
13	0.135	5.76	2-3	Siempre
14	0.124	5.08	0	Siempre
15	0.141	6.14	8-9	A veces
16	0.190	9.18	15	Siempre
17	0.170	7.94	14	A veces
18	0.220	11.04	30	De vez en C
19	0.169	7.88	10	A veces
20	0.140	6.07	3-9	De vez en C

VALORES DE REFERENCIA PARA LAS CONCENTRACIONES DE TIOCIANATO EN ORINA. <sup>(7, 9, 16)</sup>

Concentración (mg/L = µg/mL = ppm) habitual normal en F y NF

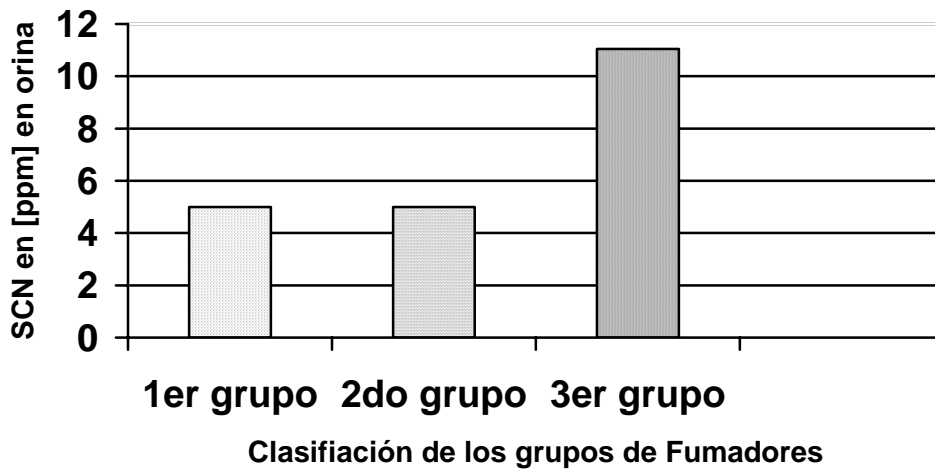
Suero o Plasma	Orina
1-4 en NF	1-4 en NF
3-12 en F	7-17F

NF = No Fumadores F = Fumadores

En la tabla 6.7 se indican los valores de tiocianato en las muestras de orina de las personas estudiadas, indicando si fuman o no, de las cuales se les aplico una encuesta previa, realizada a cada uno de ellos donde se les preguntó si eran o no fumadores activos y cuantos cigarros consumían por día, así como también el consumo en la dieta de leguminosas.

En los niveles de tiocianato encontrados en la orina podemos hacer una nueva clasificación, dividiendo en tres grupos a los fumadores y no fumadores en la siguiente gráfica.

**Gráfica 6.3: Niveles de Tiocianato en orina VS Hábito de fumar**



*1er. grupo: fumadores pasivos; 2 Grupo: fumadores activos moderados y 3er. Grupo: fumadores activos.*

Primer Grupo Fumadores pasivos: personas nº 6, 7, 9, 14

Segundo Grupo Fumadores activos moderado: personas nº 1, 2, 4, 13

Tercer Grupo Fumadores activos: personas nº 3, 5, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20

De esta clasificación se observa que de las cuatro personas del primer grupo que no fuman cigarros directamente, presentan una concentración tiocianato de: 4.96 a 5.70ppm comparado con los del segundo grupo: las cuatro personas que fuman de forma activa moderada presentaron una concentración de tiocianato 5.33 a 5.70ppm.

Se puede observar en estos resultados que el indicador en el consumo de cigarro es directamente proporcional como también a los que están expuestos. Dicho lo anterior es consecuencia, el padecimiento de todos los perjuicios que el tabaco conlleva de forma involuntaria, y son el grupo de los fumadores pasivos.

Sólo el grupo de personas no expuestas al humo del cigarro se pueden considerar verdaderamente no fumadores, sea este grupo de los no expuestos, los cuales reportaron resultados en la tabla 5.14 es decir que la prueba es negativa.

Los valores de referencia nos indican este parámetro para hacer el análisis en la determinación y cuantificación indirecta de Tiocianato de los tres grupos de personas. Para estos casos en lo particular no se alcanzaron niveles de concentración de hasta 17ppm como lo marca el límite y el cual se puede deber a que este tipo de población hace un consumo de cigarro en promedio, de 9 cigarros por día. Se necesitaría hacer un análisis de los que consumen más de una cajetilla de cigarros.

El tipo de dieta parece ser que no tiene influencia alguna como en los casos 6, 7 donde la prueba es negativa, para el consumo de leguminosas en la dieta y el aumento en la concentración de Tiocianato, a pesar de que ambas personas no consumen cigarro, para descartar esta hipótesis se tendría que llevar el estudio en personas que consumen leguminosas y que no fumen o este expuestas al humo del cigarro para diferenciar cierta determinación.

En la primera etapa de experimentación se determino y cuantifico Tiocianato de forma indirecta, se llevo a cabo la determinación en 20 personas que inicialmente cumplían con los requisitos de ser fumadores activos, o sea una población homogénea de fumadores. En la segunda etapa se eligieron a parte otros 20 donadores de los cuales fue una población heterogénea con variantes de fumar, no fumar o estar expuestos al humo del cigarro. Considerando de esta forma suficientes pruebas experimentales para la determinación de tiocianato en orina y de los cuales se representa de forma estadística.

## 7. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la identificación y determinación de tiocianato en orina así como su cuantificación de forma indirecta, mediante las curvas de calibración indirecta.
- Se propuso una técnica sensible para la determinación de dichos compuestos en los estándares y las muestras de orina por espectrofotometría de absorción molecular.
- Se obtuvo un tiempo óptimo de 3 horas, el cual fue el apropiado en la incubación para que se llevarán a cabo las reacciones a una temperatura de 30-40°C, y a su vez que se formase tal compuesto para evidenciar la formación de ácido cianhídrico (HCN) en la tira de papel picrato, con la cual se pudo determinar tiocianato (SCN) de forma indirecta, en los estándares como en las muestras de orina. Por lo tanto se demuestra que existe una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de tiocianato y sus respectivas absorbancias con base a los datos obtenidos en las curvas de calibración. con esto se concluye que existe un vínculo en la estequiometría de la reacción, de la cual por consiguiente, se determinó tiocianato presente en las muestras de orina.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en las absorbancias, esta técnica cumple con los requerimientos de reproducibilidad, sensibilidad, linealidad y repetibilidad que son puntos mínimos de una metodología, por lo que se debe considerar para su posterior validación y documentación.
- Para a las condiciones de análisis, se obtuvo un porcentaje del 96.13% en promedio de recuperación de tiocianato mediante la fijación de Ácido cianhídrico en la tira reactiva, en un tiempo de tres horas.
- El método de curva de calibración y la absorbancia de una tira reactiva en elución tiene un comportamiento lineal el cual está indirectamente relacionado con su estequiometría, para hallar la concentración de tiocianato en el estándar y en la muestra biológica.
- Con esto se puede concluir para la elaboración como parte de un manual de prácticas por espectrofotometría de absorción molecular (EAM), en el cual se utilizará en prácticas a nivel docencia. sirviendo como material didáctico para los estudiantes.

## 8. *ANEXOS*

## ANEXO 1.

### PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

#### SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TIOCIANATO DE POTASIO.

Se preparó un stock de Tiocianato de potasio de concentración 100ppm o 0.001M para obtener un volumen de 200ml.

$$100\mu\text{g/ml}(1\text{mg}/1000\mu\text{g}) = 0.1\text{mg/ml}$$

$$\text{Sí a } 0.1\text{mg/ml}(1\text{mmol}/98\text{mg}) = 1.020408 \times 10^{-3}\text{M de KSCN}$$

Calibrada la balanza analítica se pesó aproximadamente: 20.9213mg considerando la pureza y se disolvió con agua destilada llevando al aforo de 200ml.

Sin embargo se necesita tener una solución de 50ppm la cual se hizo una dilución para obtener la concentración deseada. Se tomó una alícuota de 25ml. Los cuales se llevaron a un aforo de 50ml con ácido sulfúrico de concentración 2M.

$$[1.02408 \times 10^{-3}\text{M}][25\text{ml}] = 0.025602\text{mmol}$$

$$\frac{0.025602\text{mmol}}{50\text{ml}} = 5.1204 \times 10^{-4}\text{M} \text{ o } 50\text{ppm}$$

Con pipetas volumétricas de 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; y 6ml se tomaron las respectivas alícuotas y se llevaron a un aforo de 10ml con solución ácida. Obteniendo los siguientes sistemas:

$$50\text{ppm}(0.5/10) = 2.5\text{ppm}$$

$$50\text{ppm}(1/10) = 5\text{ppm}$$

$$50\text{ppm}(2/10) = 10\text{ppm}$$

$$50\text{ppm}(3/10) = 15\text{ppm}$$

$$50\text{ppm}(4/10) = 20\text{ppm}$$

$$50\text{ppm}(5/10) = 25\text{ppm}$$

$$50\text{ppm}(6/10) = 30\text{ppm}$$

$$*\text{ppm} = \mu\text{g/ml}$$

## PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ÁCIDA

Preparar una solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) de concentración 2M para obtener un volumen de 500ml.

$$0.5\text{L}(2\text{mol/L})(98.08\text{gRA}/1\text{mol})(100\text{gRA}/96.7\text{gRP})(1.84\text{ml}/1.84\text{RA}) = 55.12\text{ml.de H}_2\text{SO}_4$$

Tomar o colocar los mililitros en una probeta graduada y medir 55.12ml. Colocarlos en un vaso de 400ml con agua destilada y agregar el reactivo con una varilla de vidrio poco a poco. Agregar el ácido al agua. Y aforar finalmente a 500ml con agua destilada colocarlos en un recipiente de plástico con capacidad de la misma, y rotular la solución.

## PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE PERMANGANATO DE POTASIO.

Preparar una solución de  $\text{KMnO}_4$ [0.008M] para obtener un volumen de 100ml.

$$0.1\text{L}(0.008\text{mol/L})(158.04\text{gRP}/1\text{mol})(100\text{gRA}/99\text{Rp})= 0.12770909\text{g de reactivo analítico.}$$

Colocarlos en un vaso de-precipitado agregarle agua destilada disolver con una varilla de vidrio hasta que los cristales de se disuelvan por completo.

## PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ÁCIDO PÍCRICO CON BICARBONATO DE SODIO.

Preparar una solución de ácido pícrico al 1% calibrar la balanza analítica y pesar 1g de ácido pícrico reactivo analítico disolver en agua destilada y aforar a 100ml de agua destilada.

Preparar una solución de carbonato de sodio al 10% calibrar la balanza y pesar 10gramos de reactivo analítico y disolver en agua destilada, a esta solución se calienta un poco para ayudar su disolución.

Una vez hechas estas soluciones se mezclan finalmente hasta homogenizarse esto hace un volumen de 200ml el cual sirve para elaborar más de cien tiras reactivas.

## ANEXO 2

### ABREVIATURAS

• EAM	Espectrofotometría de Absorción Molecular
• SCN <sup>-</sup>	Tiocianato
• HCN	Ácido cianhídrico
• H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
• KMnO <sub>4</sub>	Permanganato de Potasio
• RP	Reactivo Puro
• RA	Reactivo Analítico
• λ	Longitud de Onda
• P	Propiedad o Absorbancia (As)
• nm	Nanómetros
• PH	Potencial Hidrógeno
• ppm	Partes por millón
• µg/mL	Microgramos por mililitro
• µL	Microlitros
• mg	Miligramos
• STD	Estándar
• °C	Grados Celsius
• TVCM	Tabla de Variación de Cantidades Molares
• In	Inicio
• Ag	Agregar
• Eq	Equilibrio
• Rxn	Reaccionan
• ξ	Ypsilon (Reactivo limitante)
• V <sub>stock</sub>	Volumen del Stock
• C <sub>stock</sub>	Concentración del Stock
• V <sub>St</sub>	Volumen del estándar
• C <sub>St</sub>	Concentración del estándar
• V <sub>aforo</sub>	Volumen de aforo



- PM           Peso molecular expresado en (g/mol o mg/mmol)
- M            Concentración molar expresada en (mmol/ml y mol/L)
- C.V.        Coeficiente de variación
- X            Promedio
- S            Desviación estándar
- %           porcentaje
- Ej.         ejemplo
- cm         centímetros
- pp         Páginas consultadas
- LDD        Limite De Detección
- $\hat{y}_i$         Y ponderada
- $\Sigma$        Sumatoria
- Erg         Ergios
- VLU        Valores Limites Umbrales
- T.A.        Temperatura ambiente

**ANEXO 3.**

**Tabla 8.0: TABLA DE LOS VALORES DE PERCENTILES DE LA DISTRIBUCIÓN DE t**

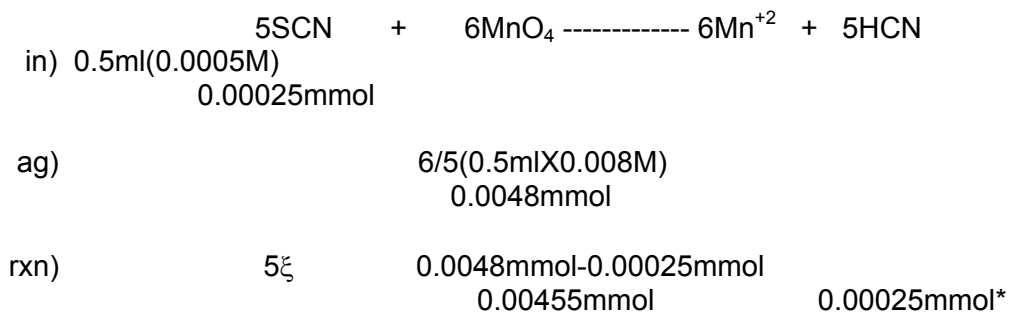
**Nivel de confianza**

<b>Grados de libertad</b>	<b>0.90t</b>	<b>0.95t</b>	<b>0.975t</b>	<b>0.99t</b>
1	3.078	6.3138	12.706	31.821
2	1.886	2.9200	4.3027	6.965
3	1.638	2.3534	3.1825	4.541
4	1.533	2.1318	2.7764	3.747
5	1.476	2.0150	2.5706	3.365
6	1.440	1.9432	2.4469	3.143
7	1.415	1.8946	2.3646	2.998
8	1.397	1.8595	2.3060	2.896
9	1.383	<b>1.8331</b>	2.2622	2.821
10	1.372	<b>1.8125</b>	2.2281	2.764
11	1.363	1.7959	2.2010	2.718
12	1.356	1.7823	2.1788	2.681
13	1.350	1.7709	2.1604	2.650
14	1.345	1.7613	2.1448	2.624
15	1.341	1.7530	2.1315	2.602
16	1.337	1.7459	2.1199	2.583
17	1.333	1.7396	2.1098	2.567
18	1.330	<b>1.7341</b>	2.1009	2.552
19	1.328	1.7291	2.0930	2.539
20	1.325	1.7247	2.0860	2.528

#### ANEXO 4.

Tabla de Variación De cantidades Molares (TVCM). Para hacer el calculo de cantidad del producto de formación y su respectiva relación estequiométrica.

##### Empleando un volumen inicial 0.5ml de tiocianato, Para el sistema 1

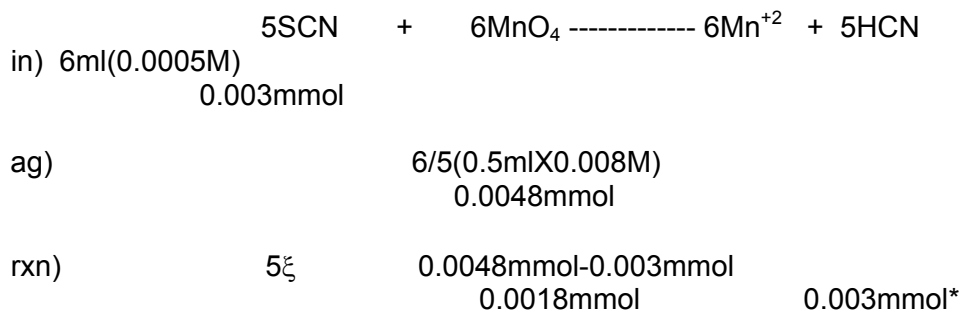


Relación estequiométrica

\*Concentración de HCN respectivamente en un volumen de aforo de 10ml por lo tanto es:

$$0.00025\text{mmol HCN}/10\text{ml} = 0.000025\text{M equivalente a } 2.5\text{ppm. De HCN}$$

##### Empleando un volumen final 6ml de tiocianato. Para el sistema 7



Relación estequiométrica

\*concentración de HCN respectivamente en un volumen de aforo de 10ml por lo tanto es:

$$0.00025\text{mmol HCN}/10\text{ml} = 0.0003\text{M equivalente a } 30\text{ppm. De HCN}$$

## ANEXO 5.

**Criterios de aceptación para determinar el tiempo de incubación con respecto a la concentración.**

Prueba de hipótesis para la media.

Hipótesis Nula  $H_0 X_1 = X_2$

Hipótesis Alterna  $H_1 X_1 < X_2$

Si  $t$  experimental es  $< t(n-1, 0.95)$  :  $H_0$  se Acepta, no existe evidencia suficiente que las concentraciones cambien con respecto al tiempo de incubación.

Si  $t$  experimental es  $> t(n-1, 0.95)$  :  $H_0$  se Rechaza, existe la evidencia suficiente que las concentraciones cambien con respecto al tiempo de incubación. <sup>(6,15, 23)</sup>

El intervalo de confianza al 95% para la media.

Anexo 6

Tabla 8.1: Absorbancias obtenidas de los estándares de Tiocianato  $\lambda = 530\text{nm}$

SISTEMAS	Concentración Teórica [ppm]	Concentración Experimental. [ppm]	Absorbancias	C.V. %
1	2.5	2.49	1.523 1.495 1.573 1.543 1.529 1.535	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$ C.V.=1.66 $\bar{X} = 1.533$ S = 0.0255499
2	5	4.99	1.442 1.445 1.494 1.449 1.455 1.475	C.V.=1.39 $\bar{X} = 1.460$ S = 0.0203764
3	10	9.98	1.292 1.295 1.321 1.264 1.286 1.285	C.V.=1.43 $\bar{X} = 1.290$ S = 0.0184688
4	15	14.97	1.063 1.119 1.082 1.016 1.071 1.109	C.V.=3.41 $\bar{X} = 1.076$ S = 0.036784
5	20	19.96	0.911 0.907 0.834 0.887 0.872 0.895	C.V.=3.21 $\bar{X} = 0.884$ S = 0.0283948

**Tabla 8.2: Absorbancias obtenidas de la solución del compuesto formado en la tira de papel picrato a partir de los estándares de tiocianato en un tiempo de elución de 3 horas a una temperatura de 30-40°C  $\lambda = 510\text{nm}$ .**

SISTEMAS	Concentración Teórica [ppm]	Concentración Experimental. [ppm]	Absorbancias	C.V. %
1	2.5	2.49	0.090 0.089 0.094 0.094 0.092 0.091 $\bar{X} = 0.091$	1.91
2	5	4.99	0.111 0.110 0.106 0.112 0.110 0.115 $\bar{X} = 0.110$	2.66
3	10	9.98	0.216 0.215 0.220 0.216 0.216 0.221 $\bar{X} = 0.217$	1.15
4	15	14.97	0.291 0.290 0.289 0.278 0.289 0.299 $\bar{X} = 0.289$	2.32
5	20	19.96	0.350 0.358 0.352 0.360 0.358 0.360 $\bar{X} = 0.356$	1.19

**Tabla 8.3: Absorbancias obtenidas de la solución del compuesto formado en la tira de papel picrato a partir de los estándares de tiocianato en un tiempo de elución de 6 horas a una temperatura de 30-40°C  $\lambda = 510\text{nm}$ .**

SISTEMAS	Concentración Teórica [ppm]	Concentración Experimental. [ppm]	Absorbancias	C.V. %
1	2.5	2.49	0.110 0.112 0.111 0.115 0.116 0.118 $\bar{X} = 0.113$	2.76
2	5	4.99	0.189 0.181 0.185 0.189 0.185 0.200 $\bar{X} = 0.188$	3.46
3	10	9.98	0.300 0.306 0.295 0.290 0.295 0.290 $\bar{X} = 0.296$	2.08
4	15	14.97	0.408 0.405 0.410 0.412 0.400 0.390 $\bar{X} = 0.404$	2.00
5	20	19.96	0.519 0.510 0.524 0.515 0.512 0.531 $\bar{X} = 0.518$	2.52

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Bermejo, M. Francisco. Química analítica general cuantitativa e instrumental. Ed. Paraninfo. 6<sup>ta</sup>. España .1991. vol.I. pp 405, 407,413.
2. Burriel, Fernando. Química Analítica Cualitativa. 18<sup>a</sup>. Ed. Thompson. España. 1985. Pp. 689-690; 884-886.
3. Casarret & Doull. Manual de Toxicología. 5<sup>a</sup>. México. 2001. Ed. Pp596-597.
4. Clarke´s. Analysis of Drugs and Poison. Vol. I. 3<sup>a</sup>. Ed. Pharmaceutical press. USA. 2004. pp. 270, 271.
5. Córdoba. Darío. Toxicología. Colombia. 2001. Ed. Manual Moderno. Pp. 301-311
6. Daniel, Wayne W. Bioestadística. 4<sup>a</sup>. México. 2002. Ed. Limusa. pp. 150-195
7. Benninton, James. L. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Ed. Panamericana. España. 1991. pp 1530, 1535.
8. Dreisbach, Robert H. Toxicología clínica. 6<sup>ta</sup>. Ed. Manual Moderno. México .1999. Pp. 120-122; 346-347.
9. Et al. Limites de exposición profesional para agentes químicos. Ed. Osalan. España 2003. pp 9-19, 32, 33.
10. Greenberg. Arnold E. Standard Methods. Ed. Joint Editorial Board. 6ta. USA 1985
11. Harris, Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Ed. Iberoamericana. México 1999.
12. Harvey, David. Química analítica moderna. Ed. Mc Grow-Hill. España 2002. pp. 77-98.
13. Horwitz, William. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>th</sup> Ed. AOAC international. U.S.A. Vol. II. Chapter 49. 2000. pp. 61,62
14. Hawley. Diccionario de Química y de Productos Químicos Ed. Omega España 1993. pp. 222, 708, 710, 774, 900, 929.
15. Miller, J. C. & Miller, J. N. Estadística para Química Analítica. 2<sup>a</sup>.Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. USA. 1993. pp. 87-114, 120, 187.
16. Plunket, M. D. Manual de toxicología industrial. Ed. Instituto vasco de seguridad y salud laborales. España 1974. pp. 40-43,505.
17. Rezaul, Haque M. And Howard Bradbury\* J. Simple Method for Determination of Thiocyanate in Urine. **Clinical Chemistry** 45:9 1459-1464 (1999).
18. Skoog, Holler. Fundamentos de Química Analítica. 8<sup>ta</sup>. Edición ED. Thomsom, 2005. España. Pp 717-747



19. Skoog, Holler. Principios de Análisis Instrumental. 5ta. Ed. Mc grow Hill España 2001. pp. 121-148
20. Tesis Zamora Jiménez Lilia. Optimización y Validación de un método Espectrofotométrico indirecto para la cuantificación de potasio en comprimidos efervescentes. FESC-UNAM. México1993. PP. 10-15
21. The Merck Index. Merck and Co. Ray way. N. J. 20<sup>th</sup>. USA. 1996. Pp.1274.
22. Trease, George E. Farmacognosia. Ed. Continental. México 1971. PP. 656.
23. Walpole, Ronald E. Bioestadística. 6<sup>ta</sup>. Ed. Pretince Hall. México 2000. pp. 238-400.