



BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**“Evaluación de los parámetros de desempeño
para la determinación de Cu^{2+} utilizando
5,10,15,20-Tetrafenilporfirina como sensor
colorimétrico”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

Presenta:

Arleth Xahuentitla Zamora

Director de tesis:

Dr. José Luis Gárate Morales

Asesor de tesis:

Dra. María Obdulia Sánchez Guadarrama

Diciembre 2020



AGRADECIMIENTOS

Con cariño, respeto y admiración a mis padres, fuentes inagotables de amor y constancia en la vida, que con su ejemplo me guían por el camino del bien, gracias por la mejor de las herencias.

Mi mayor gratitud al director de mi tesis, el Dr. José Luis Gárate Morales, por brindarme la confianza y apoyo para realizar este proyecto, por su paciencia y por sus grandes enseñanzas.

A la Dra. María Obdulia Sánchez Guadarrama, por guiarme y corregirme a lo largo de este proceso.

A mi jurado, D.C. Adriana Hernández, M.C. Esteban Sánchez y D.C. Dolores Judith Caballero, por su tiempo y sugerencias que me brindaron para la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del departamento de química analítica, quiénes han sido un gran apoyo y compañía durante todo este tiempo, por compartir momentos de diversión y de conocimiento.

Finalmente, a mis hermanos, amigos y familia, quiénes siempre me brindaron su apoyo y amistad incondicional, en especial a mis amigos Josué Rodríguez, Adrian Ordoñez, Alejandra Luna y Karina Sacramento.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>TPP</i>	5,10,15,20-Tetrafenilporfirina
<i>LD</i>	Límite de detección
<i>LC</i>	Límite de cuantificación
<i>S_b</i>	Desviación estándar de la pendiente
<i>S_a</i>	Desviación estándar de la ordenada
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>IC</i>	Intervalo de confianza
<i>IR</i>	Infrarrojo
<i>A</i>	Ordenada en el origen de la recta de regresión.
<i>b</i>	Pendiente de la recta de regresión.
<i>b</i>	Sesgo
<i>cv</i>	Coefficiente de variación.
<i>Ca</i>	Concentración analítica
<i>n</i>	Tamaño muestral.
<i>r</i>	Coefficiente de correlación.
<i>r²</i>	Coefficiente de determinación.
<i>%R</i>	Porcentaje de recobro.
<i>SD</i>	Desviación estándar de una muestra.
\bar{x}	Media aritmética de una muestra.
\hat{Y}	Valores de y pronosticados por la recta de regresión.
<i>S_{y/x}</i>	Desviación estándar de errores aleatorios.

Contenido

AGRADECIMIENTOS	2
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	3
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Contaminación de metales pesados	7
Definición de metales pesados	7
Características generales de los metales pesados más importantes	7
1.2 Sensores químicos.....	20
Sensores ópticos	20
1.3 Métodos espectroscópicos.....	21
Fundamento de técnicas de absorción molecular.....	22
1.4 Complejos de coordinación.....	24
1.5 Porfirinas.....	25
Definición	25
Tipos de porfirinas	26
Propiedades espectrales de porfirinas.....	30
1.4 Validación de métodos.....	33
Clasificación de métodos analíticos	35
Parámetros de desempeño.....	36
2. JUSTIFICACIÓN	41
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVO GENERAL	42
5. OBJETIVOS PARTICULARES	42

6. METODOLOGÍA	43
Instrumentación y reactivos	43
Preparación de disoluciones	44
Síntesis química de 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)	45
Purificación de 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)	46
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Caracterización de 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)	47
UV-Visible	47
Infrarrojo	48
Valoración espectrofotométrica para la detección de Cu^{2+}	49
Reacción ligante-metal	49
Metodología para determinación de parámetros estadísticos.....	51
Intervalo lineal.....	51
Intervalo de trabajo	57
Límite de detección y cuantificación	59
Sesgo y recuperación	62
9. PROPUESTAS	65
10. ANEXOS	67
Protocolo de trabajo para la evaluación de los parámetros en la determinación de Cu^{+2} mediante técnica de UV-Visible.....	67
Extracción de Protoporfirina a partir de huevo café.	68
10. Bibliografía	69

RESUMEN

Actualmente, la contaminación ambiental es uno de los problemas de mayor preocupación en el planeta, ya que representa una amenaza ambiental y de salud para todos los seres vivos. Los recursos hídricos y el suelo se han visto gravemente afectados en las últimas décadas debido a la rápida industrialización del planeta, la cual tiene como uno de sus desechos principales metales pesados, los cuales pueden ser absorbidos por los seres vivos, generando graves problemas de salud.

Debido a lo anterior, la necesidad de generar estrategias analíticas fáciles de realizar y accesibles, que permitan detectar contaminantes como metales pesados, permite expandir el interés por el desarrollo de nuevos sensores químicos. Una alternativa con resultados prometedores son las porfirinas, ya que son fáciles de obtener y presentan una alta sensibilidad de detección, lo que permite reconocer fácilmente concentraciones muy pequeñas debido a que pueden formar complejos de coordinación al estar en contacto con el metal contaminante. Las propiedades fotofísicas de las porfirinas son las que permiten que la detección de trazas metálicas sea mucho más fácil de apreciar, debido a que las bandas de absorción en el espectro de UV-Visible cambian cuando se tiene un complejo de coordinación, con respecto a la porfirina libre.¹

En la presente tesis se hace una investigación de la sensibilidad de la tetrafenilporfirina como detector de iones Cu(II) , la cual es realizada bajo condiciones normales del laboratorio de Química Analítica y representa una parte fundamental como sensor colorimétrico puesto que sus aplicaciones son enfocadas a la detección de metales pesados, los cuales resultan ser tóxicos para el ambiente y la salud humana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación de metales pesados

La contaminación ambiental se posiciona como uno de los problemas más importantes que afectan a la sociedad del siglo XXI. La pérdida de la buena calidad del aire, del recurso hídrico y de suelos disponibles para actividades agrícolas se ha incrementado exponencialmente, por lo que la seguridad alimentaria y de salud pública se ve afectada, principalmente por contaminación de metales pesados, siendo las actividades de minería, fundición, refinación y vertido de aguas residuales las principales fuentes antropogénicas.²

Definición de metales pesados

Según la tabla periódica, los metales pesados son elementos químicos con alta densidad (mayor a 4 g/cm³), masa y peso atómico por encima de 20 (unidades), y generalmente son tóxicos aún en concentraciones bajas. Algunos de estos elementos son: Aluminio (Al), Bario (Ba), Berilio (Be), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Estaño (Sn), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Arsénico (As), Cromo (Cr), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Plata (Ag), Selenio (Se), Talio (Tl), Vanadio (V), Oro (Au) y Zinc (Zn).³

Características generales de los metales pesados más importantes

Los metales pesados son algunos de los contaminantes ambientales más peligrosos, debido a que no son biodegradables y a su alto potencial de bioacumulación en los organismos vivos. Al no ser degradados o destruidos, los metales pesados pueden incorporarse al cuerpo humano fácilmente a través de

distintas vías de exposición, siendo las principales, el consumo de alimentos y agua potable o ser inhalados o absorbidos dérmicamente a partir de partículas de polvo provenientes de los suelos que son resuspendidas, y una acumulación de estas podría conducir a diferentes problemas de salud y ambiental.³

Cadmio

El Cadmio es un metal pesado que pertenece al grupo 12 de la tabla periódica, su estado de oxidación más común es 2+. Es considerado como uno de los elementos más tóxicos al desarrollar efectos adversos en el hombre y en el medio ambiente, debido a una bioacumulación y persistencia. El tiempo de permanencia del cadmio en suelos es de hasta 300 años y el 90% permanece sin transformarse.⁴ Las propiedades generales del Cadmio se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Propiedades generales de Cadmio.*⁵

Símbolo	Cd	Punto de fusión	321 °C
Número atómico	48	Densidad	8.650 g/cm ³
Peso atómico	112.411 g/mol	Electronegatividad	1.69
Radio atómico	161 pm	Estados de oxidación	1+, 2+
Aspecto	Color blanco ligeramente azulado.		

El Cadmio puede viajar largas distancias desde la fuente de emisión por transferencia atmosférica. Se acumula fácilmente en muchos organismos, en particular moluscos y crustáceos. Las concentraciones más bajas se encuentran en verduras, cereales y raíces con almidón. La exposición humana se produce principalmente por el consumo de alimentos contaminados, la inhalación activa y pasiva del humo del tabaco y la inhalación de los trabajadores en una variedad de industrias, por ejemplo, industrias mineras, industrias productoras de cemento.⁶ Por lo anterior, el comité mixto (FAO/OMS) estableció los siguientes lineamientos regulatorios que se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Lineamientos regulatorios por Comité Mixto FAO/OMS ⁶

Ingesta máxima tolerable mensual para Cadmio de 25 µg/kg de peso.

Cadmio en agua para consumo humano: 5 µg/L

Aire: 5 ng/m³.

La OMS menciona que la presentación y severidad de los signos, síntomas y alteraciones en un organismo se relaciona con las cantidades, el tiempo de exposición y con la vía de entrada del metal.

Toxicocinética

Investigaciones en animales han evidenciado que el mecanismo farmacológico (**Figura 1**) se describe de la siguiente manera:⁷

1. Vías de ingreso: Las principales vías son por inhalación e ingestión.
2. Absorción: Es relativamente lenta, con un promedio de 14 días en exposiciones prolongadas.
3. Distribución: La fracción que pasa a sangre se distribuye en 3 compartimentos de recambio:
 - Compartimento 1 de recambio rápido, donde no genera acumulación debido al rápido intercambio.
 - Compartimento 2 de recambio medio, constituido por los hematíes, en los que se acumula en pequeñas cantidades.
 - Compartimento 3 de recambio lento, donde una fracción significativa de cadmio se une a la metalotioneína y va a depositarse en los órganos blanco que son riñón, hígado y pulmón.

La vida media del cadmio en el organismo total es de 30 a 40 años.

4. Excreción: Las principales vías de excreción son orina y heces. Por orina, diariamente se elimina 0,007% del contenido corporal y por heces 0,03%. Tan sólo una pequeña fracción del Cadmio del compartimento sanguíneo y otra del hígado, a través de la vía biliar, se elimina por heces.

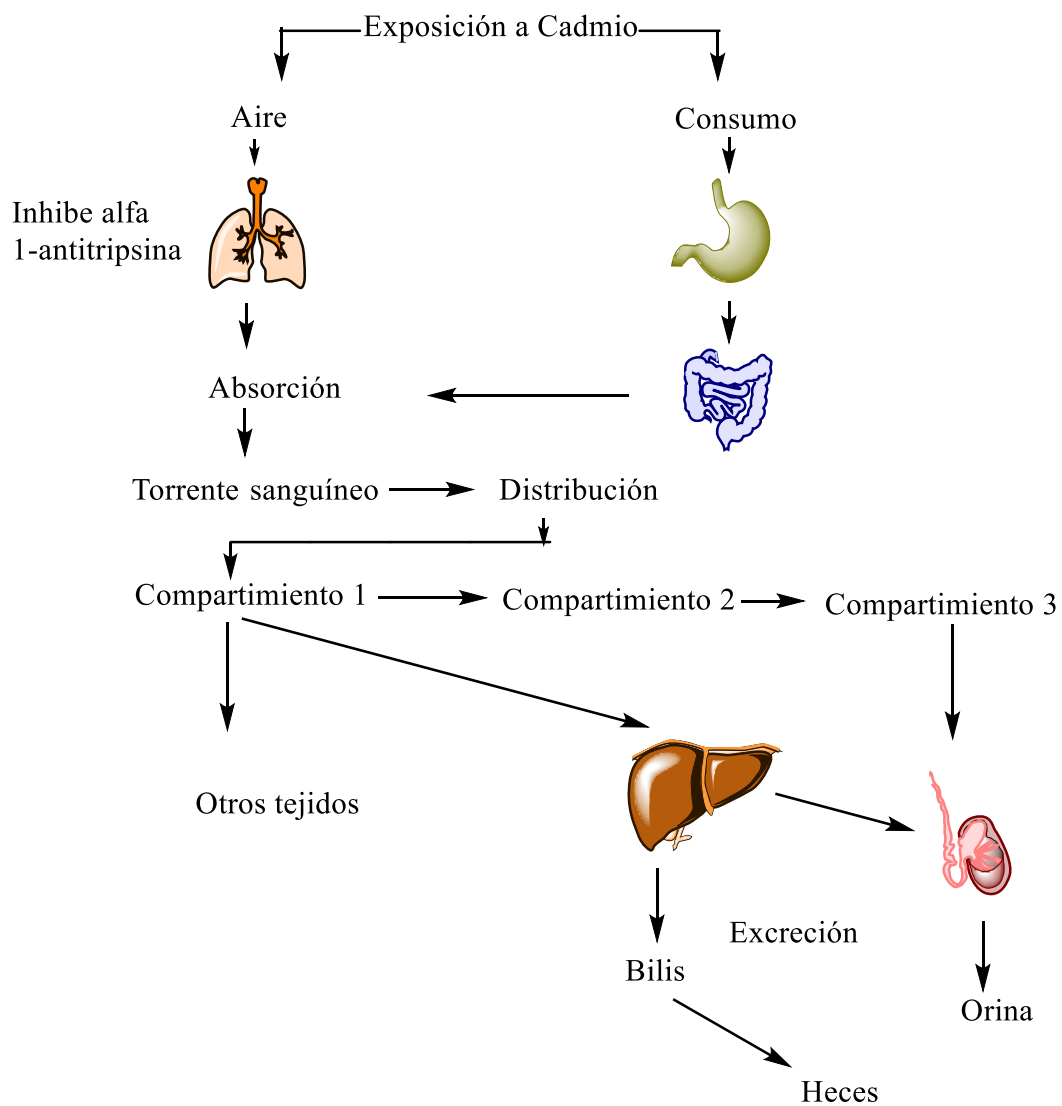


Figura 1. Toxicocinética de Cadmio en humanos.

Toxicodinámica

El cadmio es un xenobiótico y, por tanto, un metal tóxico no esencial para el organismo, que se acumula en los tejidos humanos. Los órganos blancos son riñón, hígado y pulmón.⁷

Las principales interacciones del Cadmio en el metabolismo del organismo son:

1. Unión del Cadmio a grupos tiol de proteínas intracelulares, generando la inhibición de la acción enzimática de enzimas dependientes de SH.
2. Desplazamiento del Zinc en los enlaces sulfuro con alteración enzimática y de sus procesos bioquímicos.

Durante una exposición de corta duración, la sustancia es irritante para los ojos y el tracto respiratorio, y su inhalación puede originar edema. Estos efectos pueden aparecer en unas horas y se incrementarán con el esfuerzo físico.⁷

Cuando es una exposición crónica, en el pulmón el Cadmio inhibe la alfa 1 antitripsina, inhibidor de proteasa sérica que se encarga de inhibir la elastasa producida por leucocitos en las reacciones inflamatorias; por lo tanto, la falta de acción de la alfa 1 antitripsina permite la libre acción de la elastasa lo que genera rigidez en el pulmón y enfisema pulmonar.⁸

En la sangre, el cadmio es transportado hacia el hígado, dónde se une a las proteínas para formar complejos que son transportados hacia los riñones. Cuando éste se acumula en los riñones, causa un daño en el mecanismo de filtración, que provoca la excreción de proteínas esenciales y azúcares.⁸

Plomo

El Plomo es un elemento no abundante en la naturaleza, es considerado como un metal pesado tóxico y pertenece al Grupo 14 de la tabla periódica, es una mezcla de cuatro isótopos estables, ^{208}Pb (51–53%), ^{206}Pb (23,5– 27%), ^{207}Pb (20,5– 23%) y ^{204}Pb (1,35–1,5%). El Plomo estabiliza comúnmente tres estados de oxidación: 0, 2+ y 4+. En el medio ambiente, el Plomo existe principalmente como Pb(II). El Pb(IV) solo se forma en condiciones extremadamente oxidantes y los compuestos inorgánicos de Pb(IV) no se encuentran en condiciones ambientales normales. Pb(0) existe en la naturaleza, pero su aparición es rara.⁹ Las propiedades generales del Plomo se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. *Propiedades generales del Plomo.*^{5,9}

Símbolo	Pb	Punto de fusión	327.4 °C
Número atómico	82	Densidad	11.34 g/cm ³
Peso atómico	207.2	Electronegatividad	2.33
Radio atómico	175 pm	Estados de oxidación	2+, 4+
Aspecto	Metal gris azulado, tono opaco y apagado. Flexible e inelástico.		

El Plomo metálico es resistente a la corrosión, es decir, no es atacado fácilmente por el aire o el agua, por lo que, cuando es expuesto a estos factores se forman películas delgadas de compuestos de Plomo que protegen al metal de ataques posteriores, además de que su bajo punto de fusión le permite ser moldeado fácilmente. Por ello, su fácil extracción y manejo han favorecido su explotación a lo largo de la historia y han permitido su uso en una gran cantidad de aplicaciones. Principalmente, es usado en baterías, monitores de computadores y pantallas de televisión, grifería, pigmentos, aceites, cosmetología, aleaciones, cerámicas, municiones, soldaduras, plomadas, armamento, radiación atómica e insecticidas.⁹

Toxicocinética

La toxicocinética del Plomo se resume en la **Figura 2.**¹⁰

1. Vías de ingreso: Las principales vías son por inhalación e ingestión.
2. Absorción: Es lenta, dura de 4 a 6 semanas.
3. Distribución: El Plomo se distribuye lentamente a los siguientes lugares:
 - Sangre: Acumulándose en mayor cantidad en eritrocitos que en plasma.
 - Tejidos blandos: Los principales son hígado, riñón y cerebro.
 - Esqueleto: El Plomo forma compuestos con los fosfatos.

La vida media del cadmio en el organismo total es de 30 a 40 años.

4. Excreción: Las principales vías de excreción son heces, sudor y orina.

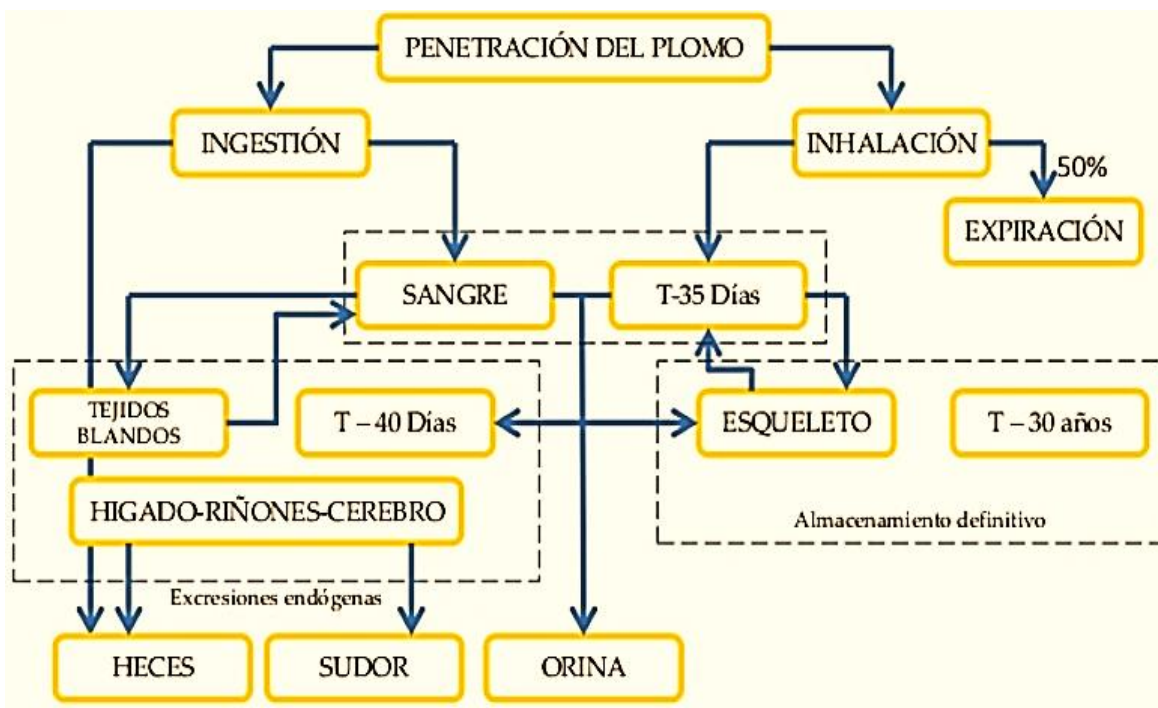


Figura 2. Toxicocinética de Plomo en humanos.

Toxicodinamia

Como se mencionó anteriormente, el Plomo no es abundante en la naturaleza, por lo que, la mayoría de los niveles altos que se encuentran en el medio ambiente provienen de actividades humanas. Su uso generalizado ha dado lugar en muchas partes del mundo a una importante contaminación del medio ambiente, un nivel considerable de exposición humana y graves problemas de salud pública.¹¹

El plomo tiene gran afinidad por los grupos sulfhídrico, en especial por las enzimas dependientes de zinc. El mecanismo de acción es complejo; en primer lugar, parece ser que el plomo interfiere con el metabolismo del calcio, sobre todo cuando el metal está en concentraciones bajas, el plomo altera el calcio de las siguientes formas:¹²

- a) Reemplaza al calcio y se comporta como un segundo mensajero intracelular, alterando la distribución del calcio en los compartimentos dentro de la célula.
- b) Activa la proteinquinasa C, una enzima que depende del calcio y que interviene en múltiples procesos intracelulares.
- c) Se une a la calmodulina más ávidamente que el calcio, ésta es una proteína reguladora importante.
- d) Inhibe la bomba de Na-K-ATPasa, lo que aumenta el calcio intracelular.

Finalmente, esta alteración a nivel del calcio traería consecuencias en la neurotransmisión y en el tono vascular lo que explicaría en parte la hipertensión y la neurotoxicidad.

Por lo anterior, la toxicidad aguda se presenta luego de una exposición respiratoria a altas concentraciones, con encefalopatía, insuficiencia renal y síntomas gastrointestinales. La toxicidad crónica es la más frecuente y se manifiesta con compromiso multisistémico: hematopoyético, del sistema nervioso, gastrointestinal, riñón y sistema reproductor.¹²

Mercurio

El Mercurio es un elemento metálico presente de manera natural en la corteza terrestre, y puede ser transportado en el ambiente por el aire y el agua. Se libera a la atmósfera en forma de vapor en fenómenos naturales como la actividad volcánica, los incendios forestales, el movimiento de masas de agua, la erosión de rocas y procesos biológicos. Las fuentes antropógenas de mercurio contribuyen significativamente a las concentraciones ambientales de este y comprenden las operaciones de minería, los procesos industriales, la combustión de combustibles fósiles, la producción de cemento y la incineración de residuos sanitarios, químicos y municipales.¹³ Las propiedades generales del Mercurio se describen en la **Tabla 4.**

Símbolo	Hg	Punto de fusión	-39 °C
Número atómico	80	Densidad	13.534 g/cm ³
Peso atómico	200 g/mol	Electronegatividad	2.00
Radio atómico	171 pm	Estados de oxidación	4+, 2+, 1+
Aspecto	Es un líquido blanco plateado a temperatura ambiente.		

La exposición de la población general a especies de Mercurio puede producirse a partir de muy diversas fuentes,¹⁵ las principales son:

- Contacto con productos que contienen Mercurio (termómetros, barómetros, termostatos, esfigmomanómetros, interruptores eléctricos, baterías, pinturas, etc.).
- Exposición a amalgamas de empastes dentales.
- Inhalación de aire ambiente cerca de refinerías y minas de mercurio.
- Ingestión de alimentos o agua de bebida contaminados con mercurio.
- Uso de medicamentos tradicionales o herbarios (como antisépticos, diuréticos o laxantes).

Toxicocinética

La toxicocinética del Mercurio presenta las siguientes fases,¹⁶ además se resumen en la **Figura 3**:

- Vías de ingreso: Las principales vías son respiratoria, digestiva y cutánea.
- Transporte y distribución: Absorbido el Mercurio es transportado por la sangre, donde su distribución en el organismo tiende a alcanzar un estado de equilibrio dinámico determinado por dosis, duración de la exposición, grado de oxidación, concentración de sus compuestos en la sangre, concentración en relación con grupos sulfhídricos libres, afinidad con los componentes celulares y velocidad de asociación/disociación del complejo Mercurio-proteína.
- Excreción: El Mercurio no absorbido se excreta por las heces, el absorbido se excreta por el colon, riñones, saliva y pequeñas cantidades por sudor.

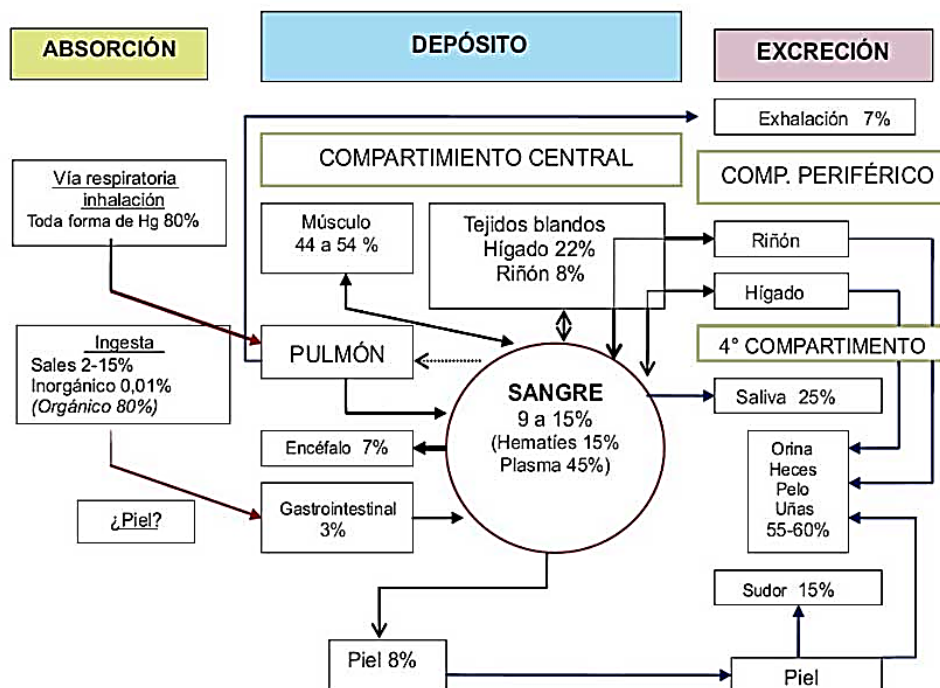


Figura 3. Toxicocinética de Mercurio en humanos.

Toxicodinamia

El Mercurio es tóxico, porque precipita las proteínas sintetizadas por la célula, principalmente las neuronas, y porque inhibe los grupos sulfhídrico de varias enzimas esenciales. En estado iónico, se fija a los grupos celulares ricos en radicales -SH, altera varios sistemas metabólicos y enzimáticos de la célula y su pared e inhibe la síntesis de proteínas en la mitocondria, afectando su función energética.¹⁷

En el riñón disminuye la actividad de las fosfatasas alcalinas de los túbulos proximales y altera el transporte de potasio y la ATP-asa en la membrana. En el encéfalo, la neurona de cerebro y cerebelo es la parte más sensible.¹⁷

En el sistema enzimático, inhibe enzimas esenciales: catalasas plasmáticas, colineste rasa globular, glutatión-reductasa globular, glutatión-reductasa cerebral, galactoxidasa, dopa-decarboxilasa, monoamino-oxidasa, glicero fosfatasa, succino-deshidrogenasa, di y trifosfo-piridín-nucleótido. Por todo esto, el mercurio puede causar lesión celular en cualquier tejido donde se acumule en concentración suficiente.¹⁷

Cobre

El Cobre es un elemento químico clasificado como metal de transición, es un sólido a temperatura ambiente y es considerado como el elemento número 26 en abundancia en la corteza terrestre, lo cual es equivalente al 0.5-5%, encontrándose principalmente, en rocas, suelo, agua y aire. El Cobre es un oligoelemento esencial en plantas y animales (incluidos los humanos), lo que significa que es necesario para que los seres vivos puedan cumplir funciones biológicas.¹⁸ Las propiedades generales del Cobre se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. *Propiedades generales del Cobre*^{5,18}

Símbolo	Cu	Punto de fusión	1085 °C
Número atómico	29	Densidad	8.960 g/cm ³
Peso atómico	63.546 g/mol	Electronegatividad	1.99
Radio atómico	145 pm	Estados de oxidación	+1, +2, +3, +4
Aspecto	Metal de color cobrizo.		

Su gran utilidad se debe a su abundancia en la naturaleza y a la combinación de sus propiedades químicas, eléctricas, físicas y mecánicas. La mayor parte del cobre del mundo se obtiene de los sulfuros minerales como la calcocita, covelita, calcopirita, bornita y enargita. Tiene dos isótopos naturales estables que son ⁶³Cu y ⁶⁵Cu y nueve isótopos inestables (radiactivos). De cientos de compuestos fabricados de manera industrial, el más importante es el sulfato de cobre.¹⁹

El Cobre se usa en equipo eléctrico, maquinaria industrial, construcción, en aleaciones de bronce: latón, níquel, clavos, pernos, objetos decorativos, tuberías, techos, monedas, utensilios de cocina, joyería, muebles, maquillaje, pinturas, instrumentos musicales y medios de transporte.¹⁹

Toxicocinética

Se absorbe en la mayor parte de los segmentos del conducto gastrointestinal, incluyendo el estómago y el intestino grueso, siendo en un 30-40 % dicha absorción en el tracto digestivo proximal.²⁰

Tras la absorción se une a la albúmina y a la transcuprina y se distribuye principalmente en el hígado, cerebro, corazón, riñón y parte pigmentada del ojo. Más del 90% del cobre plasmático se encuentra ligado a la ceruloplasmina. Se estima que el contenido corporal de cobre es en el organismo humano en torno a los 70 mg. Se excreta principalmente por la bilis.²⁰

Toxicodinamia

El Cobre es esencial para mantener buena salud. Sin embargo, la exposición a dosis altas puede ser perjudicial, pues en su estado oxidado (Cu^{2+}) participa en reacciones en las que se producen radicales hidroxilos libres (OH^{\cdot}). Estas especies reactivas de oxígeno atacan a las membranas a través del proceso peroxidación lipídica, desestabilizan su estructura y afectan sus funciones celulares. También pueden oxidar directamente a las proteínas y desnaturalizar el ADN y el ARN, lo que puede provocar daños que contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y al envejecimiento celular.²¹

La exposición a polvos de cobre puede irritar la nariz, la boca, los ojos y causar dolores de cabeza, mareo, náusea y diarrea.

La exposición aguda por ingestión del sulfato de cobre puede producir necrosis hepática y muerte. La exposición crónica de alimentos conservados en recipientes de cobre genera lesiones hepáticas en niños.²²

1.2 Sensores químicos

Los sensores químicos surgen de la necesidad de aumentar la sensibilidad para realizar procesos de detección de agentes de interés.

Según la IUPAC, un sensor químico es definido como un dispositivo capaz de proporcionar información química específica, formado por un elemento de reconocimiento que está en contacto directo con un elemento de transducción, donde la información química obtenida del sensor se convierte en una señal analítica útil, que permiten la detección de diferentes agentes. El desarrollo de sensores químicos ha sido un importante objeto de investigación de varias áreas del campo analítico, entre ellas, el monitoreo ambiental, diagnóstico médico o el control de calidad en la industria, los cuales, se encuentran directamente relacionados con la salud y la seguridad alimentaria.²³

Los sensores químicos pueden clasificarse de diferentes maneras y según su naturaleza de la señal que se obtiene de la interacción sensor-analito son:

- Sensores electroquímicos: Se incluyen sensores conductimétricos, amperométricos y potenciométricos.
- Sensores de masa
- Sensores calorimétricos
- Sensores ópticos

Sensores ópticos

Los sensores ópticos incluyen a todos los sistemas que aprovechan la interacción materia-radiación electromagnética y utilizan como señal de detección a una onda de este tipo. En este caso, la evaluación del cambio puede relacionarse con la concentración del analito y el fundamento de este tipo de sensores se centra en la espectroscopia clásica, donde la ubicación de la onda dentro del espectro

electromagnético permite realizar la medición. Dentro de esta clasificación, se encuentran los sensores colorimétricos o sensores basados en la absorción de luz visible, cuya principal característica de medición consiste en el cambio de propiedades ópticas del sistema dentro del rango visible del espectro. Lo cual indica que, la señal transmitida por el sensor como consecuencia de la interacción con el analito, es un cambio de color del sistema detectable por el ojo humano, que puede ser tanto en la intensidad del tono original como en el pasaje de un color a otro. El procesamiento de la señal lumínica puede ser medida mediante un equipo espectrofotométrico en el rango de UV-Visible para obtener datos más precisos y confiables.²³

1.3 Métodos espectroscópicos

Los métodos espectroscópicos son técnicas que nos permiten identificar y caracterizar compuestos midiendo la radiación electromagnética producida (emitida) o absorbida por especies moleculares o atómicas de interés. La radiación electromagnética (fotones) es una forma de energía transmitida a través del espacio a grandes velocidades, y puede ser descrita como una onda con propiedades de longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud.²⁴

Estas técnicas, utilizan las interacciones de la radiación con la materia para obtener información sobre una muestra, lo que permite realizar análisis cuantitativos y cualitativos, normalmente la muestra es estimulada de alguna manera mediante la aplicación de energía en forma de calor, energía eléctrica, luz, partículas o de una reacción química. Antes de aplicar el estímulo, el analito se encuentra predominantemente en su estado de energía más bajo, o estado basal. El estímulo causa que algunas de las especies del analito experimenten una transición hacia un estado de mayor energía, o estado excitado, adquiriendo información sobre el analito, ya sea midiendo la radiación electromagnética emitida conforme este regresa a su estado basal o midiendo la cantidad de radiación electromagnética absorbida como resultado de la excitación, como se observa en la **Figura 4**.

La parte de una molécula responsable de la absorción de la luz se conoce como cromóforo.²⁵

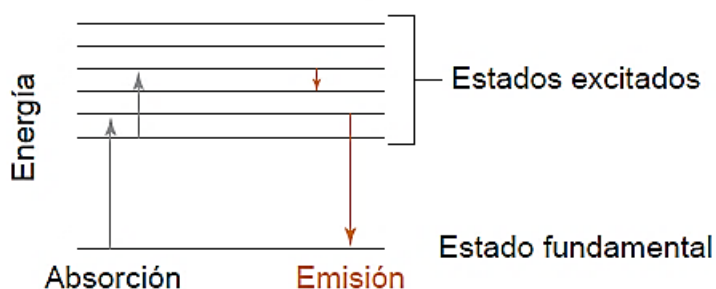


Figura 4. Representación de energía de una molécula cuando es expuesta a luz.²⁵

La diferencia entre las técnicas dependerá de la región en que las moléculas absorben energía. En el caso de radiación de IR estimula el movimiento vibracional de las moléculas cuando la absorben, y en el caso de las radiaciones ultravioleta-visible hacen que los electrones pasen a orbitales de mayor energía, la región del ultravioleta (UV cercano) comprende de 195 a 400nm y la región visible de 400-780 nm. Los rayos X y la radiación UV de longitud de onda corta rompen enlaces químicos y ionizan a las moléculas.²⁵

Fundamento de técnicas de absorción molecular

El fundamento de la técnica de absorción molecular se basa en la ley de Lambert-Beer, que indica cuantitativamente la forma en que el grado de atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud del trayecto en el que ocurre la absorción. Cuando la luz atraviesa un medio que contiene un analito absorbente, disminuye su intensidad como consecuencia de la excitación del analito. Debido a las interacciones de los fotones con las partículas absorbentes, la fuerza radiante del haz se reduce de P_0 a P .

La **transmitancia** (T) de la solución es la fracción de radiación incidente que se expresa como un porcentaje, denominado porcentaje de transmitancia.²⁴

$$T = \frac{P}{P_0}$$

La **absorbancia** (A) de una solución se relaciona con la transmitancia de manera logarítmica de tal manera que se reduce la transmitancia a medida que aumenta la absorbancia de la solución, obteniendo la siguiente igualdad.

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P}$$

Por lo tanto, la ley de Beer menciona que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente c y a la longitud de trayecto b del medio de absorción, como se expresa en la siguiente ecuación:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

Donde:

a: Es la constante de proporcionalidad llamada **absortividad**.

Dado que la absorbancia es una cantidad sin unidades la absortividad debe tener unidades que eliminen a las de b y c .

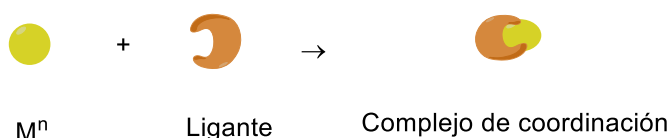
Cuando se expresa la concentración con moles por litro, y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se llama **absortividad molar** y recibe el símbolo ϵ .

$$A = \epsilon bc$$

La absortividad molar tiene las unidades $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1.4 Complejos de coordinación

Un complejo de coordinación es el resultado de la interacción de un átomo central con un ligante mediante la formación de un enlace covalente coordinado, como se representa en la **Figura 5**. Este complejo tiene propiedades físicas y químicas características definidas, es decir, sus propiedades serán diferentes de las del ion metálico o ligantes que lo constituyen.²⁵



*Figura 5. Representación de un complejo de coordinación.
donde **M**: Metal y **n**: No.de oxidación.*

El enlace covalente coordinado se forma cuando un elemento aporta dos electrones a átomos con orbitales vacíos con el objetivo de alcanzar la estabilidad, siguiendo la Regla del Octeto, propuesta por Lewis.²⁵ Por esto, los componentes de los complejos de coordinación deben tener las siguientes características:

Átomo central: Debe disponer de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones, comportándose como ácido de Lewis. Generalmente, los metales de transición sobresalen en la formación de este tipo de complejos, pero no son los únicos, los cationes del grupo 1 y 2 también disponen de orbitales vacíos, sin embargo, su tendencia a captar electrones es baja.²⁶

Ligantes: Actúan como base de Lewis al donar pares de electrones no compartidos y pueden clasificarse en:

- Ligantes monodentados: Son aquellos que poseen un solo átomo dador, y por tanto ocupan una posición en la esfera de coordinación.
- Ligantes polidentados: Son aquellos que ocupan dos o más posiciones en la esfera de coordinación, también son conocidos como ligantes quelatos.

1.5 Porfirinas

Las porfirinas y sus derivados hoy en día representan una de las familias más importantes de compuestos en bioquímica, debido a su fácil síntesis y alta sensibilidad como sensor químico.²⁷

Recientemente, las porfirinas han mostrado grandes promesas para la detección de metales pesados en solución, gracias a que poseen notables propiedades fotofísicas. Una de las características más importantes, es que las porfirinas son buenos receptores funcionales para varios iones metálicos con los que puede formar un complejo de coordinación. Por esto, se han diseñado una serie de sensores ópticos y varias técnicas de detección que incluyen absorción electrónica, fluorescencia, colorimetría y métodos electroquímicos que sirven para detectar selectivamente iones de metales pesados como Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} .²⁷

Definición

Las porfirinas son los materiales absorbentes de luz más fuertes de la naturaleza y, por lo tanto, también son conocidas como "los pigmentos de la vida".²⁸

Son una familia de macrociclos formadas por cuatro anillos pirrólicos que se encuentran unidos por puentes de metino.²⁸ La porfirina de base libre (**Figura 6**) tiene 11 dobles enlaces y puede ser transformada en una metaloporfirina (**Figura 7**) al reemplazar dos hidrógenos internos del pirrol por un ion metálico.²⁹

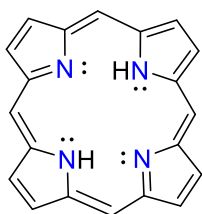


Figura 6. Estructura química de porfirina no coordinada.

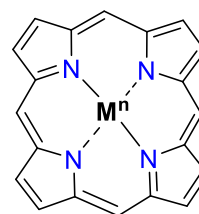


Figura 7. Estructura química de porfirina coordinada, también conocida como metaloporfirina, donde **M**:Metal y **n**: No. de oxidación.

Tipos de porfirinas

Generalmente las porfirinas se combinan fácilmente con metales formando metaloporfirinas, donde el metal se encuentra coordinado dentro de la cavidad del macrociclo. La función y especificidad depende de los patrones de sustitución en los diferentes heterociclos, al igual que, de la presencia y características del ion metálico coordinado.²⁹ Las metaloporfirinas pueden ser de origen natural o sintético.

Porfirinas de origen natural

Las porfirinas naturales son sustituidas generalmente en la posición β debido a que tienen la ventaja de su similitud con las porfirinas de origen biológico, uniéndose en esta posición con proteínas, como se muestra en la **Figura 8**.²⁹

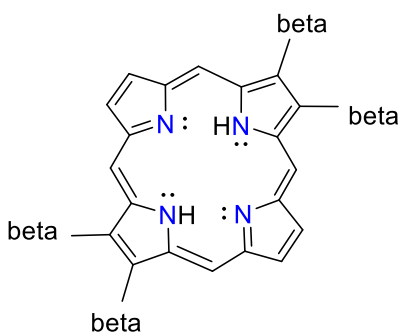


Figure 8. Estructura química de porfirina no coordinada que indica las posiciones β donde puede ser sustituida.

Existen porfirinas no coordinadas de forma natural como: feofitina, coproporfirina, uroporfirina (isómeros I y II), protoporfirina y tetrapirrol de cadena abierta como los pigmentos de bilis (bilirrubina y biliverdina). Sin embargo, las metaloporfirinas desempeñan papeles más esenciales, principalmente clorinas de clorofilas y bacterioclorofilas, protoporfirina de hierro (II) en la hemoglobina, protoporfirina en mioglobina, citocromos, vitamina B12. En la **Figura 9** se muestran metaloporfirinas que se encuentran de forma natural.²⁹

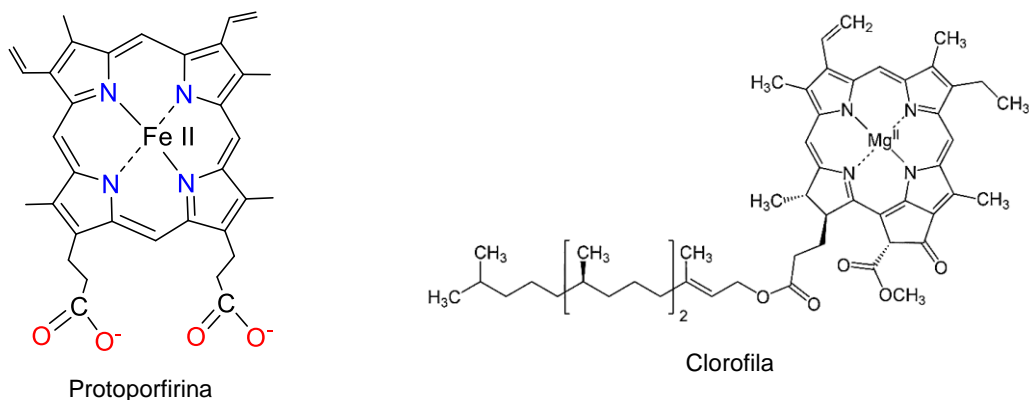


Figura 9. Estructura química de metaloporfirinas de tipo naturales más estudiadas.

Una de las metaloporfirinas más estudiadas es el grupo hemo, el cual actúa como grupo prostético en diferentes proteínas, como la hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasas, peroxidasas y reductasas.³⁰

La hemoglobina es una proteína constituida por cuatro cadenas polipeptídicas unidas a un grupo prostético cada una (**Figura 10**). Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. El grupo hemo es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro, quien les proporciona el color rojo a los eritrocitos (**Figura 11**). El tipo de porfirina de la hemoglobina es la protoporfirina IX, formada por dos grupos de ácido propiónico, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina, como se observa en la **Figura 12**.³¹

El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (Fe^{2+}) y puede formar 5 o 6 enlaces de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno a la hemoglobina. Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal. El quinto enlace de coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina. Finalmente, el sexto enlace del átomo ferroso es con el O_2 . Tanto el quinto como el sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo de porfirina. La parte porfirínica del grupo hemo se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas.³²

La función principal de la hemoglobina es transportar O_2 de los pulmones hacia los tejidos y CO_2 más protones (H^+) de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretados.³²

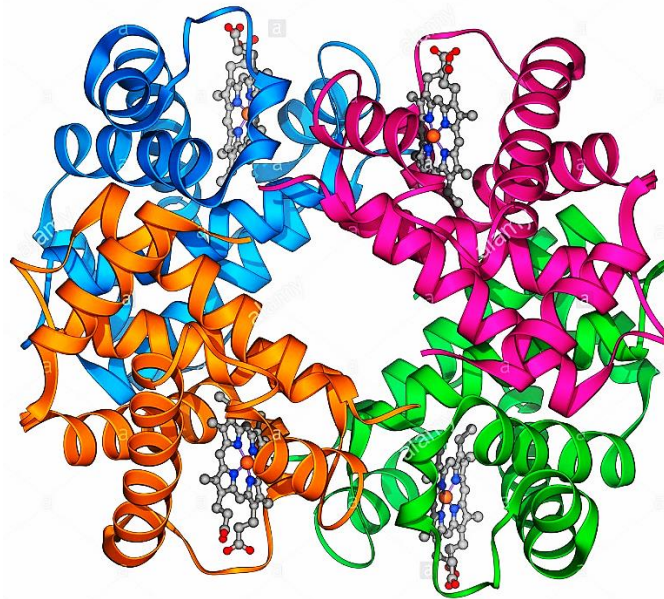


Figura 10. Estructura de hemoglobina.³²

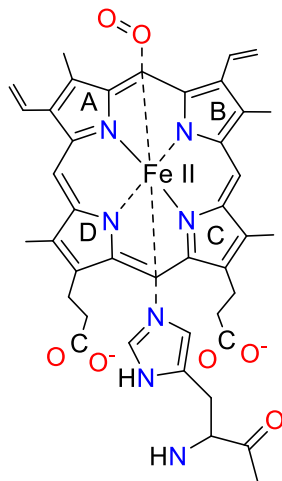


Figura 11. Estructura química del grupo hemo de hemoglobina.

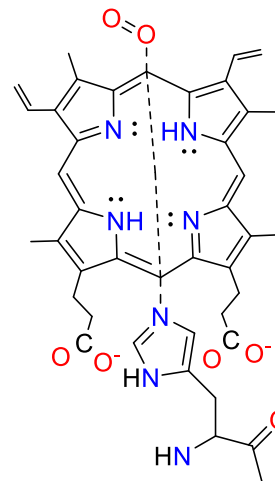


Figura 12. Estructura química de protoporfirina IX.

Porfirinas sintéticas

Las metaloporfirinas sintéticas generalmente contienen sustituyentes en las posiciones meso, como se muestra en la **Figura 13**, puesto que no tienen parte biológica directa, pero son de fácil acceso sintético y tienen gran variedad de aplicaciones.²⁷

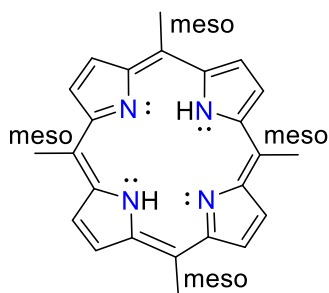


Figura 13. Estructura química de porfirina no coordinada que muestra la posición meso donde puede ser sustituida.

Una de las aplicaciones de metaloporfirinas sintéticas, de acuerdo a la información publicada en 2010 por David K. Stevenson D. K. y Wong R. J., es utilizar los análogos de hemo sintéticos, las metaloporfirinas, ya que son inhibidores competitivos de la hemo oxigenasa (HO), enzima que limita la velocidad en la producción de bilirrubina, y su uso se ha propuesto como una estrategia alternativa atractiva para prevenir o tratar la hiperbilirrubinemia grave.³³

Propiedades espectrales de porfirinas

Las técnicas espectroscópicas han sido de gran utilidad para el estudio de las propiedades fundamentales de las porfirinas, así como para su caracterización.

Una vez que la porfirina se coordina a un metal, las metaloporfirinas comparten un par de electrones de cada uno de los átomos de nitrógeno centrales de la porfirina con el metal que actúa como un ácido de Lewis. Pero en general, el ion metálico no solo se coordina con los pares de electrones de los nitrógenos pirrolenínicos, sino que también reemplaza a dos átomos de hidrógeno de los nitrógenos de los pirroles. De esta manera, el ion metálico ocupa el centro de la cavidad de la porfirina. La formación de la metaloporfirina da, por tanto, la combinación de un anión de porfirina con un catión metálico.³⁴

Características de porfirinas en UV-Visible

La presencia de un sistema conjugado de dobles enlaces en el núcleo de las porfirinas, es el cromóforo responsable de la existencia de bandas de absorción fuertes y características en las regiones visible y ultravioleta cercano del espectro electromagnético.³⁵

El anillo tetrapirrólico está conjugado, lo cual permite tener varias formas de resonancia, posee 22 electrones π , pero solo 18 de ellos quedan incluidos en la deslocalización del sistema conjugado, de acuerdo al principio de aromaticidad de Hückel ($4n+2$, donde $n=4$).³⁶ Las porfirinas son compuestos altamente coloreados, y sus principales bandas de absorción tienen coeficientes de extinción muy elevados.³⁵

Las porfirinas presentan dos transiciones electrónicas en la región visible del espectro:

a) Una transición $\pi-\pi^*$, que se presenta como una intensa Banda Soret, que absorbe en la región ultravioleta cercano, alrededor de los 400 nm, debida a la conjugación del macrociclo, esto se comprueba ya que desaparece con su ruptura.³⁵

b) Las absorciones en la región del rojo, entre 650 y 700 nm, donde se presentan cuatro bandas de menor absorción denominadas bandas Q, las cuales corresponden a la presencia de los dos protones en los anillos pirrólicos situados en la diagonal de dos átomos de nitrógeno (**Figura 14**).³⁵

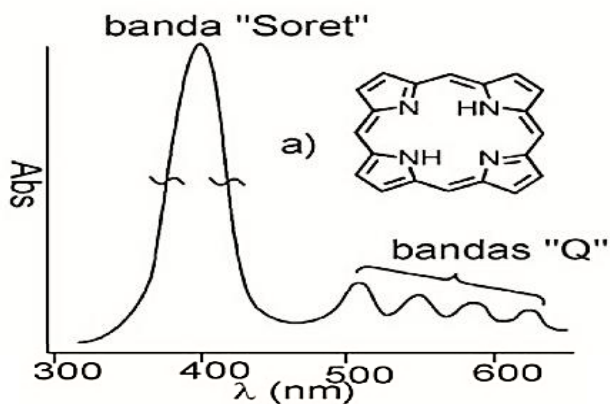


Figura 14. Espectro de UV-Visible de porfirinas no coordinadas.³⁵

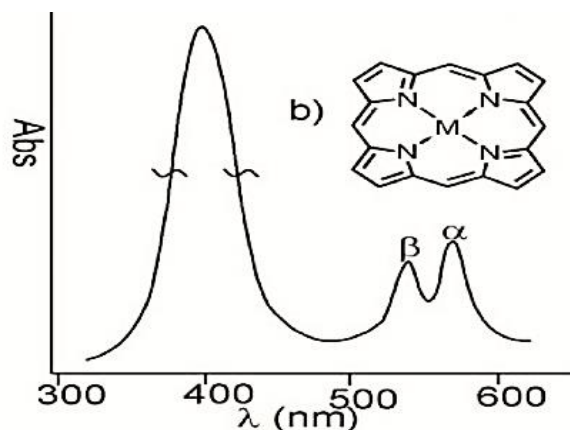


Figura 15. Espectro de UV-Visible de porfirinas coordinadas.³⁵

El cromóforo de porfirina no metalada pertenece al grupo puntual D_{2h} , mientras que la coordinación de un ion metálico en el centro del macrociclo, pertenece a D_{4h} , lo cual indica que al llevarse la metalación la simetría aumenta, debido a que los cuatro nitrógenos son equivalentes. Como consecuencia de ese aumento de simetría, de las cuatro bandas Q observables para la porfirina libre, solo se registran dos absorciones denominadas α y β , entre los 500 y 600 nm en el macrociclo coordinado³⁷, como se muestra en la **Figura 15**.

Características de porfirinas en infrarrojo

La espectroscopía de absorción infrarroja es una herramienta muy poderosa para determinar la identidad y estructura de compuestos orgánicos e inorgánicos.³⁸

Las porfirinas no coordinadas o de base libre, se caracterizan por presentar las bandas que se muestran en la **Tabla 6**, las cuales corresponden a los enlaces que componen a la molécula, la banda presente en 3309 cm^{-1} es atribuida a enlaces de extensión N-H del anillo porfirínico, en 351 cm^{-1} la banda es asociada a enlaces de extensión del tipo =C-H, en 1594 cm^{-1} se asocia con dobles enlaces C=C, en 1352 cm^{-1} se presenta la banda de mayor interés ya que ésta asociada a los enlaces C=N del macrociclo, mientras que la banda de intensidad media en 969 cm^{-1} corresponde a los estiramientos de los enlaces C-H de los grupos pirrólicos de la porfirina.³⁹

Tipo de enlace	Número de onda (cm^{-1})
ν N-H	3309
δ N-H	969
ν =C-H	3051
ν C=C	1594
ν C=N	1352
γ C-H	732

ν : extensión, δ : tijereo, γ : flexión

Cuando la porfirina de base libre se coordina con un ion metálico (metaloporfirina) se espera que el espectro de infrarrojo no muestre vibraciones de enlaces N-H, debido a que la metalación del anillo porfirínico se efectúa a expensas de la desprotonación de los grupos amínicos de la cavidad del macrociclo, mientras que los demás enlaces presentes en la molécula, se espera que mantengan un comportamiento similar a las vibraciones de porfirinas no coordinadas.³⁹

1.4 Validación de métodos

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos. Validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas.⁴⁰

En química analítica el otro uso del término de validación es en el contexto de instrumentación. La validación de la instrumentación se usa para describir el proceso de establecer que un instrumento en un momento dado se pueda operar de acuerdo con la especificación de diseño. Este proceso se podría lograr, por ejemplo, por medio de la calibración o control del funcionamiento.⁴¹

En México el concepto de validación más utilizado por los laboratorios de ensayo es el que está descrito en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2018, que particularmente es equivalente a la norma ISO/IEC 17025:2005 llamada “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, la cual establece que: “la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias que se cumplan con los requisitos particulares para un uso específico previsto”.

Esta definición implica que para validar un método analítico se deben considerar y aplicar los requisitos específicos de cada método, ya que no existe un proceso general de validación que cumpla con los requisitos particulares y fines previstos de cada método a validar, los cuales deben definirse antes de comenzar con el proceso de validación.⁴²

Los objetivos principales de la validación se basan principalmente en:

- a) Probar la aptitud de los métodos, así como la capacidad del personal y el laboratorio. La validación se apoya en los parámetros estadísticos del procedimiento.
- b) Obtener una aprobación por parte de un organismo acreditador.
- c) Aumentar la satisfacción de los clientes cuando solicitan un trabajo analítico.
- d) Brindar confianza en los resultados emitidos los cuales han demostrado ser adecuados para su propósito.
- e) Disminuir y controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato generado.
- f) Optimizar los procesos de medición al analizar lo mejor posible el mensurando, conllevando a una disminución en costos por repetición de pruebas y desperdicio de materiales y reactivos.

Dicho lo anterior, un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. La extensión de alcance de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias.

Clasificación de métodos analíticos

De acuerdo a la *Guía de validación de métodos analíticos* editada por el *Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México, A.C.*, se clasifica a los métodos analíticos tomando en cuenta diferentes criterios:

- ⇒ En función de su estado regulatorio.
 - Métodos farmacopéicos.
 - Métodos no farmacopéicos.
- ⇒ En función de su aplicación.
 - Métodos para producto a granel.
 - Métodos para producto terminado.
 - Métodos para muestra primaria.
 - Métodos indicadores de estabilidad.
- ⇒ En función de la naturaleza de la respuesta analítica.
 - Métodos físico-químicos: Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH , consumo de un acomplejante, etc.).
 - Métodos biológicos: Cuando la respuesta es de carácter biológico como el crecimiento de microorganismos, protección, muerte.
- ⇒ En función de su propósito analítico.
 - Métodos para cuantificar el analito.
 - Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
 - Métodos para identificar el analito.
- ⇒ En función de la naturaleza del sistema de medición.
 - Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos y de gases, espectrofotómetros, etc.)
 - Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.)

Parámetros de desempeño

Los parámetros para medir en el desarrollo de este proyecto son:

- Intervalo lineal
- Intervalo de trabajo
- Límite de detección y cuantificación
- Sesgo y porcentaje de recuperación

Los cuales, se definen a continuación.

Intervalo lineal

Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado. Estos datos pueden ser usados para la cuantificación del analito mediante la ley de Beer y la linealidad sobre un rango de concentración.⁴³

Para las técnicas analíticas en las cuales es necesario elaborar una curva de calibración, se debe realizar la lectura de 5 diferentes niveles de concentraciones, mínimo por triplicado. Los datos obtenidos deberán graficarse para su posterior inspección visual; utilizando la absorbancia contra la concentración, analizando la zona del ensayo y al obtenerse una línea recta, entonces podrá decirse que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.⁴³

El análisis de regresión lineal permite establecer la relación funcional o ecuación matemática que relaciona las variables, mediante la ecuación de la recta:⁴⁴

$$Y = a + bX$$

Donde:

a: Representa la ordenada.

b: Es la pendiente de la recta y representa el cambio de la variable dependiente.

De este mismo análisis se obtiene el coeficiente de correlación, que es la relación que existe de los valores entre el eje X y el eje Y.

$$r = \frac{\sum i [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\left\{ [\sum i (X_i - \bar{X})^2] [\sum i (Y_i - \bar{Y})^2] \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

Los valores que puede tomar r están en el intervalo $-1 \leq r \leq +1$, que implica que todos los puntos experimentales se encuentran sobre una línea recta, en el caso que r tome el valor de 0, implicaría que no existe correlación entre ambos ejes.

Por otro lado, el coeficiente de determinación indica qué tanto se ajusta la curva descrita por la ecuación a una línea recta y se calcula elevando al cuadrado el valor obtenido del coeficiente de correlación.⁴⁵

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y ordenada en el origen son importantes, por ello, primero se debe realizar el cálculo de $S_{y/x}$ que estima los errores aleatorios de la dirección “y”:

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

Obtenido el valor anterior es posible calcular la desviación estándar de la pendiente (S_b):

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum i (x_i - \bar{x})^2}}$$

y la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a):

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum i x_i^2}{n \sum i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Los valores de S_b y S_a se pueden usar para estimar los límites de confianza de la pendiente y la ordenada al origen. Así pues, los límites de confianza de la pendiente vienen dados por $b \pm t_{(n-2)} S_b$ donde el valor de t se obtiene para un nivel de confianza deseado y (n-2) grados de libertad.

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación y el extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica,⁴⁶ como se muestra en la siguiente **Figura 16**:

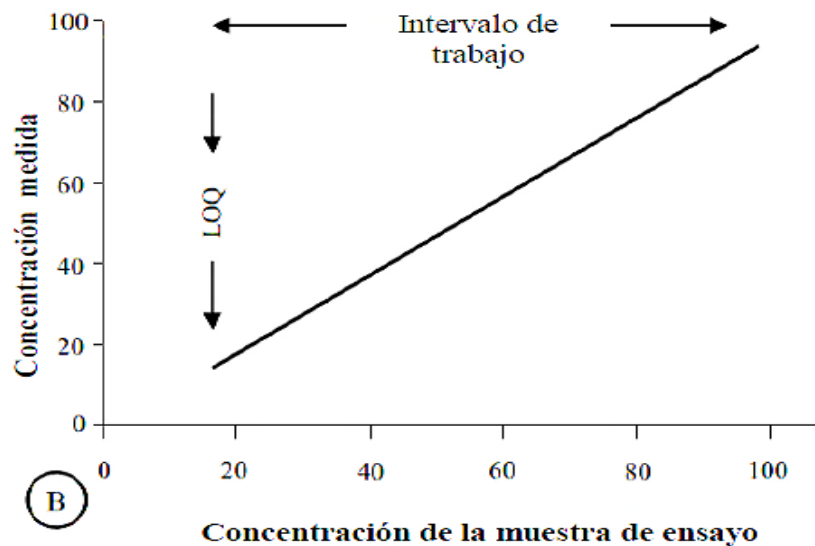


Figura 16. Representación visual de intervalo de trabajo.

Para el intervalo de trabajo se requiere utilizar mínimo 5 niveles diferentes de concentración y cada nivel por triplicado.⁴⁷

El intervalo de trabajo y la linealidad del método se evalúan mediante una inspección visual del gráfico, con el apoyo de estadísticas y un gráfico de residuales de una regresión lineal.⁴⁷

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) es la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. Mide la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (Y_B) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_B), ⁴⁸ como se muestra en la siguiente ecuación:

$$LD = Y_B + 3.3 S_B$$

El límite de cuantificación (LC) es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable. En la práctica, el LC se calcula de acuerdo a la concentración del analito correspondiente a la desviación estándar obtenida a niveles bajos multiplicada por un factor. El valor por defecto para el factor es 10 según IUPAC y si la desviación estándar es constante a bajas concentraciones, este factor de multiplicación corresponde a una desviación estándar relativa (RSD) de 10 %. ⁴⁸

En este caso el límite de cuantificación (LC) mide el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas y se sugiere que sea una señal igual a la del blanco (Y_B) más diez veces la desviación estándar del blanco (S_B) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$LC = Y_B + 10 S_B$$

Donde:

Y_B : Es la ordenada de la recta (a)

S_B : Es la desviación estándar de los residuos de "y" (**$S_{y/x}$**).

Sesgo y recuperación

El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes a éste, independientemente del laboratorio que lo utilice. Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados del método candidato con un valor de referencia adecuado. ⁴⁹

El sesgo puede expresarse en términos absolutos como:

$$b = \bar{x} - x_{ref}$$

o en término relativos en porcentaje:

$$\%b = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100\%$$

Donde:

x_{ref} : Es la concentración teórica.

\bar{x} : Es el promedio de las concentraciones obtenidas.

La recuperación o recobro es la cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través del método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje. ⁴⁹

$$R (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100\%$$

2. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre nuevos sensores ópticos es necesaria para la mejora de los procesos de detección de metales. El desarrollo de nuevos compuestos químicos ha sido utilizado como una estrategia para encontrar cromóforos cada vez más eficientes. Uno de los cromóforos más conocidos son las porfirinas, que pueden ser sintetizadas a través de metodologías sencillas, por lo que resulta interesante evaluar sus características de detección frente a Cu^{2+} y desarrollar protocolos de validación.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: El sensor químico desarrollado no mostrará sensibilidad a la detección de Cu^{2+} de acuerdo a los criterios establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC).

Hipótesis verdadera: El sensor químico desarrollado mostrará sensibilidad a la detección de Cu^{2+} de acuerdo a los criterios establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC).

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de la porfirina *5,10,15,20-Tetrafenilporfirina* (TPP) como sensor químico en la cuantificación del ion Cu^{2+} mediante las espectroscopía de UV-Vis.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar y caracterizar mediante las espectroscopias de UV-Vis e IR a la porfirina *5,10,15,20-Tetrafenilporfirina* (TPP).
- Analizar mediante las espectroscopias de UV-Vis e IR el complejo de coordinación del TPP con el ion Cu^{2+} .
- Desarrollar la mejor metodología de detección que permita evaluar la eficacia de la porfirina TPP como sensor químico frente al ion Cu^{2+} .
- Determinar el intervalo lineal y de trabajo de la metodología usada.
- Determinar el límite de detección y la cuantificación del método de la metodología usada.
- Determinar el sesgo y porcentaje de recobro de la metodología usada.

6. METODOLOGÍA

Instrumentación y reactivos

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó lo siguiente:

• Instrumentos y material de laboratorio

- Espectrofotómetro modelo Cary50 conc UV-visible Spectrophotometer marca Varian®.
- Espectrofotómetro de infrarrojo modelo Scimitar marca DIGILAB®.
- Balanza analítica modelo EP214DC marca OHAUS®.
- Papel filtro marca Whatman 2v 12.5 cm de diámetro.
- Material de uso común de laboratorio.

• Reactivos

- Ácido propiónico marca Sigma-Aldrich.
- Benzaldehído marca Sigma-Aldrich.
- Metanol marca Sigma-Aldrich.
- Pirrol marca Sigma-Aldrich.
- Acetato de cobre heptahidratado $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ marca Sigma-Aldrich.

Preparación de disoluciones

– Acetato de cobre heptahidratado $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Peso molecular: 307.63 g/mol

Se pesó 0.0822 g de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un vaso de precipitados, y se disolvió en una cuarta parte del solvente (CH_3OH) utilizado, posteriormente se transfirió a un matraz de 0.025 L realizando lavados para reducir el porcentaje de error y se llevó al aforo con CH_3OH como disolvente ($C_1=0.01\text{M}$). Se toman 0.5 ml de la C_1 con una pipeta volumétrica y se transfiere a un matraz de 0.010L y llevando al aforo con el mismo disolvente ($C_2=5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$).

– 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)

Peso molecular: 614.75 g/mol

Se pesó 0.0101 g de TPP en un vaso de precipitados, se disolvió con CH_3OH utilizando una tercera parte del volumen utilizado, se transfirió a un matraz de 0.01 L realizando lavados y se aforó con el solvente ($C_1=1.64 \times 10^{-3} \text{ M}$). Se toman 0.25 ml de C_1 y se transfiere a un matraz de 0.01 L y se afora con CH_3OH ($C_2= 4.1 \times 10^{-5} \text{ M}$). Finalmente, se toman 2.0 ml de C_2 y se colocan en un matraz de 0.050 L donde se llega al aforo con CH_3OH como disolvente ($C_3=1.64 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Síntesis química de 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)

La síntesis química se desarrolló bajo los protocolos descritos por Alan D. Adler (Figura 17).⁵⁰

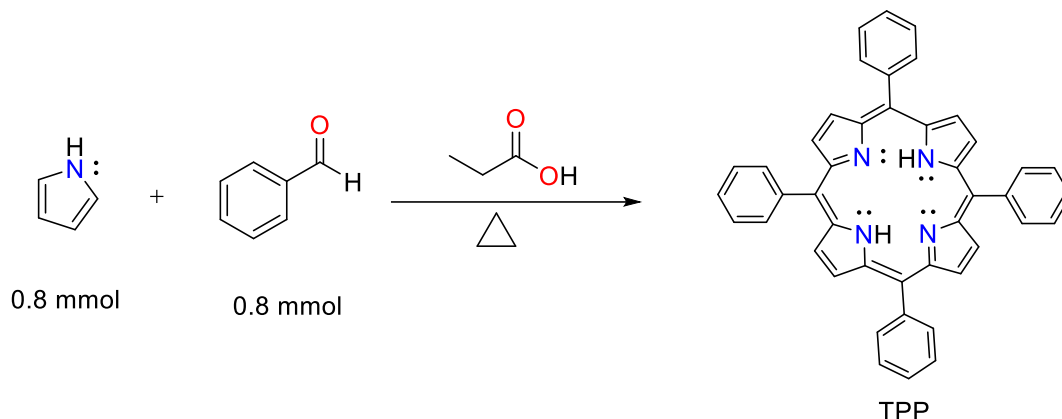


Figura 17. Esquema representativo de la síntesis de TPP.

En un matraz de bola se adicionó 20 ml de ácido propiónico, 2.0 ml de pirrol y 0.5 ml de benzaldehído en grado reactivo, la reacción se colocó en sistema de reflujo y se mantuvo en agitación constante por 30 minutos, se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente hasta la formación de una solución color negro. Posteriormente se filtró la solución color negro y se hicieron lavados con metanol observándose inmediatamente un polvo color morado sobre el papel filtro, el cual se dejó secar y posteriormente se pesó obteniendo 0.226 g de TPP, el cual representa un **7.0** % de rendimiento experimental. Posteriormente, se purificó por recristalización hasta la obtención de cristales color morado.

Fórmula química: $C_{44}H_{30}N_4$ **PM**=614.75 $g\ mol^{-1}$. **UV-Vis** [λ (nm)_{metanol}] 420, 515, 550, 590, 650. IR (KBr) [ν_{max}]= 3448(O-H), 3317 (ν N-H), 3055 y 3024 (C-H), 1597 (C=C), 1350 (C=N), 964 (δ N-H), 802 y 702 (γ C-H).

Purificación de 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)

La purificación de la porfirina se realizó por cristalización. Se disolvió en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 caliente y se hizo precipitar añadiendo lentamente 2 veces el mismo volumen de CH_3OH .

El precipitado se decantó y se dejó secar en la mufla por 15 minutos, obteniendo 0.132 g de cristales de color violeta, con un rendimiento experimental de 4.0 %. Estos cristales fueron utilizados para su caracterización y desarrollo de la metodología.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina (TPP)

UV-Visible

La **Figura 18** muestra el espectro de UV-Visible de TPP a una concentración de 1.64×10^{-6} M, usando CH_3OH como disolvente. Puede observarse una banda de absorción en 420 nm asociada a la banda Soret o banda B y cuatro bandas de menor absorción en 515, 550, 590 y 650 nm correspondientes a cuatro bandas Q, las cuales son características de las porfirinas, de acuerdo a la información mencionada anteriormente.

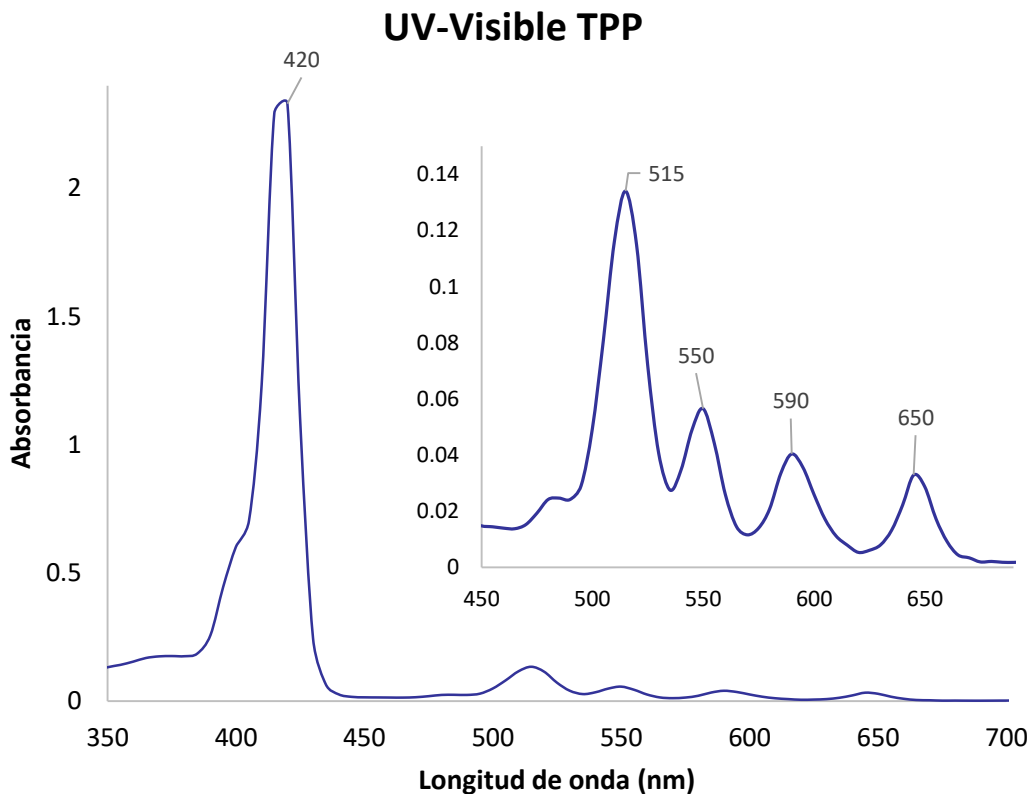


Figura 18. Espectro de absorción de UV-Visible de TPP a una concentración de 1.64×10^{-6} M⁻⁶.

Infrarrojo

En la **Figura 19** se muestra el espectro de infrarrojo de TPP donde se utilizó KBr como soporte y pueden apreciarse señales correspondientes a los grupos funcionales que forman a las porfirinas no coordinadas con base en la información anteriormente presentada. En 3448 cm^{-1} se presenta una señal que es asignada a vibraciones O-H, las cuales pueden indicar que la porfirina se encontraba hidratada. En 3317 cm^{-1} se observa una señal intensa que es atribuida al enlace de extensión N-H del anillo pirrólico. Las bandas en 3055 y 3024 cm^{-1} son asociadas a señales de enlaces C-H perteneciente a los anillos aromáticos. La señal presente en 1597 cm^{-1} se atribuye a enlaces C=C, en 1350 cm^{-1} la banda es asignada a enlaces C=N, la banda en 964 cm^{-1} es asociada con enlaces tipo tijero de N-H. Finalmente las bandas en 802 y 702 cm^{-1} son atribuidas a enlaces de flexión de C-H.

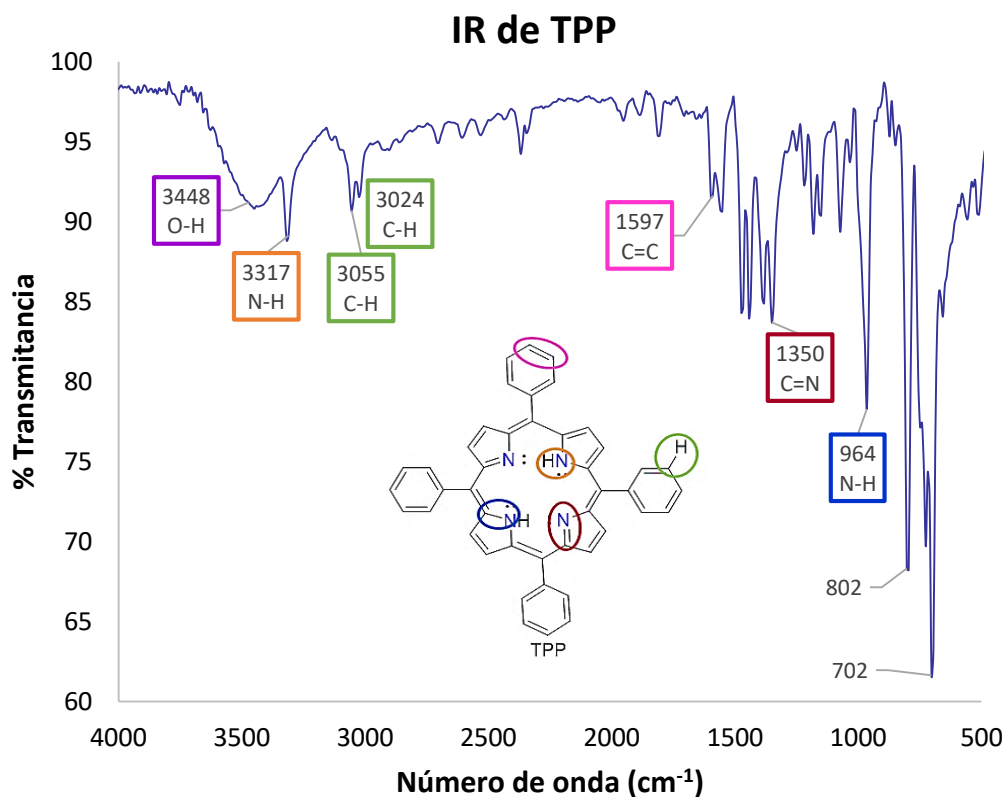


Figura 19. Espectro de infrarrojo de TPP, usando KBr como soporte.

Valoración espectrofotométrica para la detección de Cu^{2+}

Reacción ligante-metal

Para conocer la relación entre el ligante y el ion metálico (TPP-Cu) en el complejo de coordinación, se realizó un experimento con una relación TPP: Cu^{2+} en proporción 1:1, utilizando las siguientes concentraciones: C_3 (1.64×10^{-6} M) de TPP y C_2 (5.0×10^{-4} M) de Cu^{2+} y se dejó reaccionar por 20 minutos. La **Figura 20** muestra el esquema de la propuesta de la formación del complejo TPP-Cu.

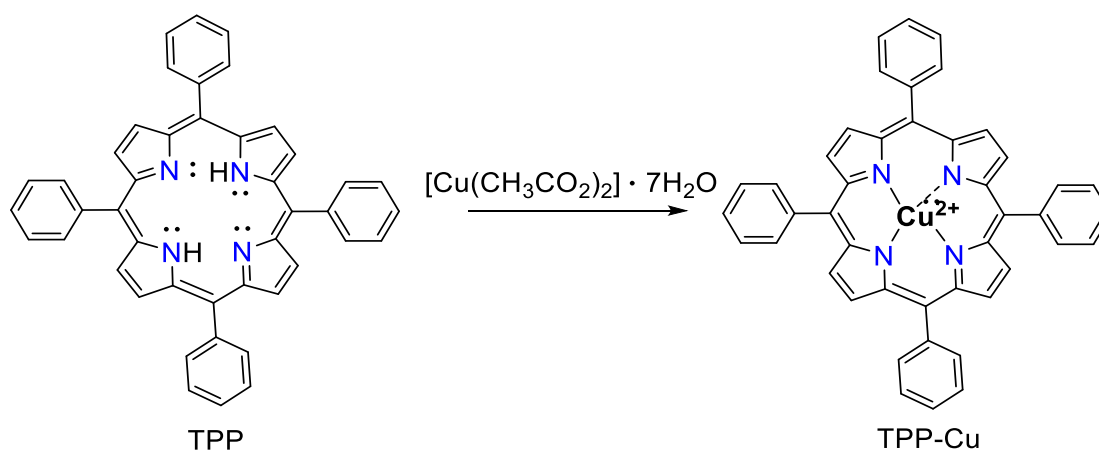


Figura 20. Esquema que muestra la propuesta de formación del complejo TPP-Cu.

Al finalizar el tiempo de reacción, se obtuvo un espectro de UV-Visible (**Figura 21**), donde puede apreciarse que las cuatro bandas Q ubicadas en 515, 550, 590 y 650 nm pasaron a ser una nueva banda de absorción en 540 nm debido a la pérdida de dos hidrógenos de la porfirina de base libre. La banda Soret se mantuvo en 415 nm con la diferencia de hacerse más angosta al estar en contacto con el metal, mostrando un porcentaje de reducción del ancho de la banda del 54.5%, lo que demuestra que, al llevarse la reacción, hubo formación del complejo TPP-Cu.

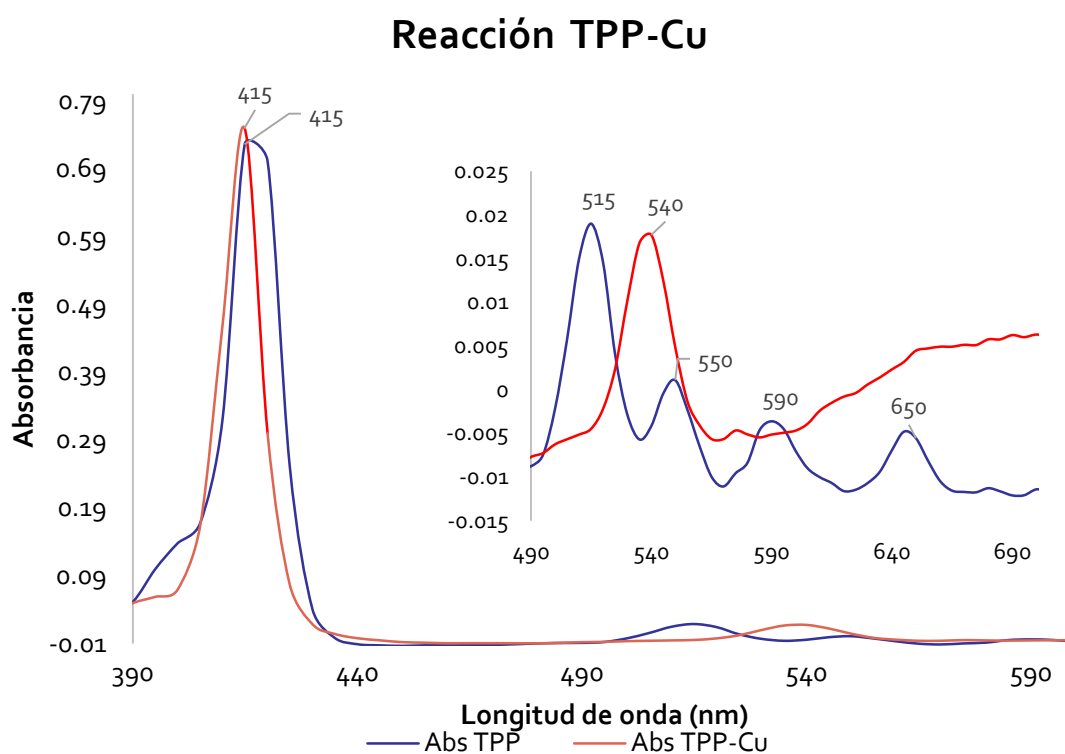


Figura 21: Espectro de absorción de UV-Visible que evalúa la reacción entre TPP y Cu^{+2} , utilizando C_3 de TPP y C_2 de Cu^{+2} . Donde se observa que hay desplazamiento de las cuatro bandas Q.

Metodología para determinación de parámetros estadísticos

Para realizar la evaluación del TPP como sensor de iones de Cu^{2+} y poder determinar todos los parámetros estadísticos, se utilizó una cubeta de cuarzo de 3 ml de volumen, se le agregaron 2.0 ml de TPP (C_3 : 1.64×10^{-6} M) y se agregaron 100 μL de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (C_2 : 5.0×10^{-4} M), se dejaron reaccionar por 20 minutos y se tomó la lectura en el espectrofotómetro de UV-Visible a una longitud de lectura de 540 nm. Inmediatamente se agregaron 100 μL más de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (C_2 : 5.0×10^{-4} M) y se repitió el mismo procedimiento hasta completar un volumen de 1000 μL de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

El procedimiento se realizó por triplicado con el objetivo de reducir el porcentaje de error.

Intervalo lineal

La linealidad del método se refiere a la relación de proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento a una longitud de onda de 540 nm y puede ser verificado visualmente a través de un gráfico de respuesta analítica vs concentración y un gráfico de datos residuales.

Para obtener este parámetro se emplearon mediciones del blanco y de 10 concentraciones conocidas de la disolución de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Estas concentraciones fueron agregadas a 2.0 mL de ligante TPP (1.64×10^{-6} M) y fueron realizadas por triplicado. Los resultados de las mediciones se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Mediciones para obtener el gráfico de intervalo lineal.

[ppm de Cu ²⁺]	Promedio _{Abs}	DS	%CV
0	0.0068	0.0000	0.3081
0.34	0.0077	0.0001	1.4307
0.68	0.0103	0.0001	0.6775
1.02	0.0113	0.0001	0.9696
1.36	0.0137	0.0001	0.5096
1.7	0.0164	0.0001	0.8970
2.04	0.0191	0.0002	0.9791
2.38	0.0211	0.0001	0.6238
2.72	0.0230	0.0001	0.3939
3.06	0.0244	0.0001	0.4274
3.4	0.0253	0.0000	0.1277

Los datos fueron obtenidos del promedio de las tres determinaciones de cada concentración.

En la **Figura 22** se muestra el gráfico de respuesta analítica expresada en absorbancia vs concentración expresada en ppm y puede apreciarse de forma visual que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración. Al realizar el ajuste de los datos por el método de mínimos cuadrados, se puede determinar el coeficiente de correlación, obteniendo un valor de 0.9946, el cual, de acuerdo con la guía CCAYAC es aceptado como un método lineal, ya que $r \geq 0.99$. Los datos de ajuste llevan a obtener la ecuación de la recta que se muestra en la **Figura 22**.

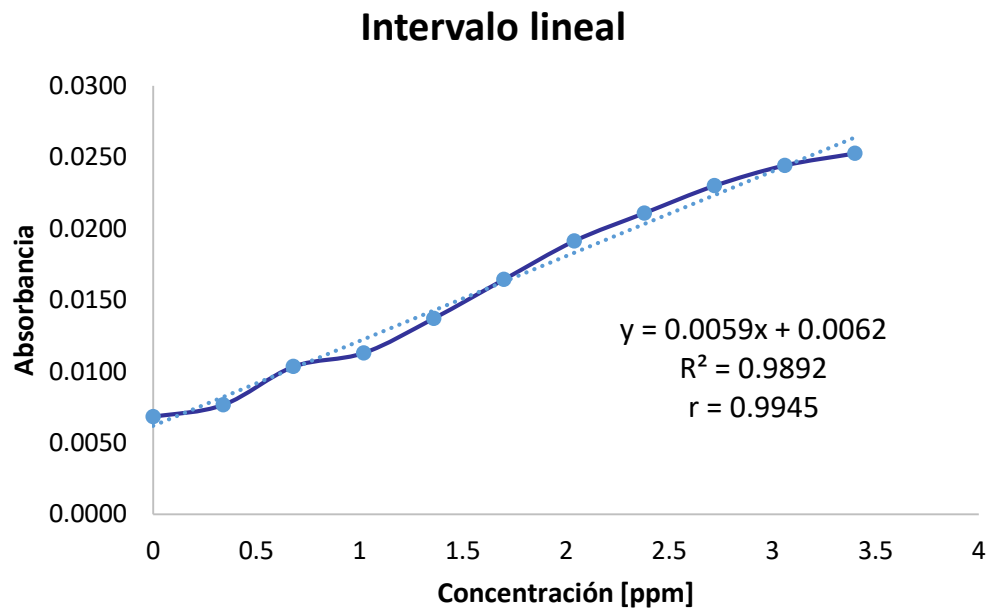


Figura 22. Gráfica obtenida a partir de los datos de la tabla 7 a una longitud de onda de 540 nm.

Los gráficos de residuales son utilizados para observar si se presentan valores atípicos, pues normalmente los residuales son distribuidos alrededor de cero.⁵¹ En la **Figura 23** se presenta el gráfico de residuales de los datos anteriores y se observa que los residuales se encuentran muy cercanos a cero, ya que van de 0.001 a -0.0015, lo cual indica que nuestros datos no presentan ningún valor atípico representando un gráfico aceptable.

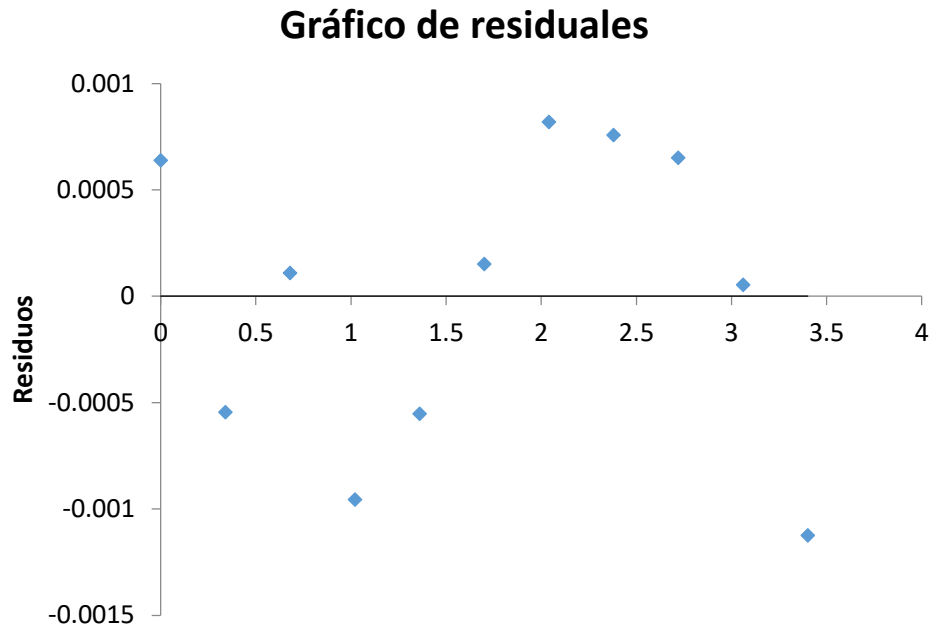


Figura 23. Gráfico de residuales mostrando los puntos cercanos a cero.

En la **Tabla 8** se resumen la información de la regresión lineal de los datos anteriores. Estos datos demuestran que el método tiene un comportamiento lineal.

Coefficiente de correlación múltiple	0.9946
Coefficiente de determinación R^2	0.9892
R^2 ajustado	0.9880
Error típico	0.0007
Observaciones	11

Estadística de regresión de los puntos de intervalo lineal.

Al verificar que $r \geq 0.99$, se procede a calcular manualmente las desviaciones estándar con el objetivo de determinar los intervalos de linealidad, tanto de la pendiente como de la ordenada, por ello en la **Tabla 8** se presentan los datos para hacer las determinaciones correspondientes.

Para calcular los intervalos de linealidad, se calculan los errores aleatorios ($S_{y/x}$) de la pendiente y la ordenada utilizando los datos de las **Tablas 7 y 8** como se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Intervalos de linealidad.							
	X_i (ppm)	Y_i (abs)	$x_i - \bar{X}$	$(x_i - \bar{X})^2$	$y_i - \bar{Y}$	$(y_i - \bar{Y})^2$	$(x_i - \bar{X}) * (y_i - \bar{Y})$
	0	0.0068	-1.700	2.890	-0.009	8.954E-05	0.016
	0.34	0.0077	-1.360	1.850	-0.009	7.442E-05	0.012
	0.68	0.0103	-1.020	1.040	-0.006	3.542E-05	0.006
	1.02	0.0113	-0.680	0.462	-0.005	2.496E-05	0.003
	1.36	0.0137	-0.340	0.116	-0.003	6.618E-06	0.001
	1.7	0.0164	0.000	0.000	0.000	2.280E-08	0.000
	2.04	0.0191	0.340	0.116	0.003	8.064E-06	0.001
	2.38	0.0211	0.680	0.462	0.005	2.302E-05	0.003
	2.72	0.0230	1.020	1.040	0.007	4.504E-05	0.007
	3.06	0.0244	1.360	1.850	0.008	6.615E-05	0.011
	3.4	0.0253	1.700	2.890	0.009	8.057E-05	0.015
Suma	18.70	0.18	0.000	12.716	0.000	4.538E-04	0.076
Promedio	1.70	0.02	0.000	1.156	0.000	4.126E-05	0.007

Valores residuales de la regresión lineal obtenidos a partir de los datos de intervalo lineal.

Donde: \bar{x} es el promedio de x_i , \bar{y} es el promedio de y_i .

Se sustituyen los valores en las fórmulas para calcular los errores aleatorios ($S_{y/x}$), como se muestra a continuación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(Y_i - \bar{Y}_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{4.538 \times 10^{-04}}{11 - 2}} = \mathbf{0.0071}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{x}_i)^2}} = \frac{0.0071}{\sqrt{12.716}} = \mathbf{0.0020}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{x})^2}} = 0.0071 \sqrt{\frac{(18.70)^2}{11(12.716)^2}} = \mathbf{0.0031}$$

Se determina el nivel de confianza en 95%, lo que es equivalente a 2.26 de acuerdo, a tablas de distribución Tstudent, donde el valor de t (n-2) es igual a 9.

- Intervalo de confianza de la pendiente el cual indica el rango permitido para ser aceptado en el ajuste de la línea recta:

$$b \pm t_{(n-2)} S_b \Rightarrow 0.0059 \pm (2.26)(0.0020) \rightarrow \mathbf{0.0059 \pm 0.0045 \text{ ppm}}$$

- Intervalo de confianza de la ordenada el cual indica el rango permitido para ser aceptado en el ajuste de la línea recta:

$$a \pm t_{(n-2)} S_a \Rightarrow 0.0062 \pm (2.26)(0.0031) \rightarrow \mathbf{0.0062 \pm 0.007 \text{ ppm}}$$

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo fue determinado por el método de adición del estándar, de acuerdo a lo establecido por la guía CCAYAC, donde a un volumen constante de 2.0 mL de C₃ (1.64×10^{-6} M) de TPP se le adicionó un volumen variable de C₂ (5.0×10^{-6} M) de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, como se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10. *Intervalo de trabajo mostrando las concentraciones y volúmenes de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.*

Concentración teórica adicionada de Cu^{2+} (ppm)	Volumen añadido (mL)	Abs
0	0	0.0068
0.68	0.2	0.0103
1.36	0.4	0.0137
2.04	0.6	0.0191
2.72	0.8	0.0230
3.4	1.0	0.0253

Las absorbancias son obtenidas del promedio de tres determinaciones.

Para calcular la concentración obtenida a partir del volumen añadido se utiliza la ecuación de la recta obtenida con los datos de la gráfica de intervalo lineal (**Figura 22**), y se obtienen los resultados que se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. *Comparación de concentraciones.*

Concentración teórica adicionada (ppm)	Concentración corregida obtenida (ppm)
0	0
0.68	0.69
1.36	1.27
2.04	2.19
2.72	2.85
3.4	3.24

Los valores de esta tabla fueron obtenidos a partir de la **Tabla 10**.

Para demostrar una relación lineal, los datos deben ser expresados mediante una gráfica, mostrando la concentración obtenida vs la concentración adicionada. Por ello, se muestra la gráfica de la **Figura 24** donde se observa una linealidad entre la concentración obtenida y adicionada con un coeficiente de correlación de 0.9955. Los datos de la ecuación de la recta resultante del ajuste de los datos se muestran en el recuadro de la **Figura 24**.

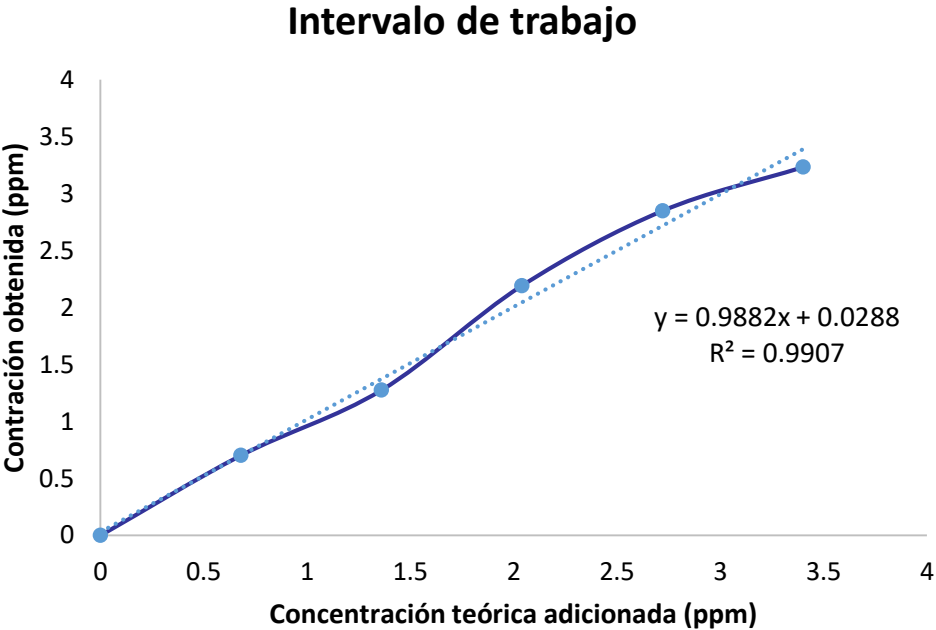


Figura 24. Gráfico que muestra la linealidad en el intervalo de trabajo.

Límite de detección y cuantificación

Para determinar el límite de detección y cuantificación se utilizó la C₃ de TPP y C₂ de Cu(CH₃CO₂)₂ • 7H₂O. Fue empleado el blanco y 10 puntos de concentración, además de que cada nivel fue determinado por triplicado como se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Límite de detección y cuantificación.

Réplicas	Blanco		Concentración (ppm)								
	0	0.34	0.68	1.02	1.36	1.7	2.04	2.38	2.72	3.06	3.4
1	0.0069	0.0077	0.0103	0.0112	0.0138	0.0163	0.0191	0.0211	0.0231	0.0244	0.0253
2	0.0068	0.0078	0.0104	0.0112	0.0138	0.0164	0.0190	0.0209	0.0229	0.0245	0.0253
3	0.0068	0.0076	0.0103	0.0114	0.0136	0.0166	0.0193	0.0212	0.0230	0.0244	0.0252
Promedio	0.0068	0.0077	0.0103	0.0113	0.0137	0.0164	0.0191	0.0211	0.0230	0.0244	0.0253
DS	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000
%CV	0.3081	1.4307	0.6775	0.9696	0.5096	0.8970	0.9791	0.6238	0.3939	0.4274	0.1277

Los valores presentados equivalen al promedio de las determinaciones por triplicado.

La regresión lineal es utilizada como un método analítico que permite estimar la concentración de muestras por medio de interpolación, por lo que es utilizada para determinar los límites de detección y cuantificación de este experimento.⁵² En la **Tabla 13** se muestran los valores obtenidos a partir del intervalo lineal.

Tabla 13. Datos de intervalo lineal

n	11
a (intersección)	0.0062
b (pendiente)	0.0059
S_{y/x}	0.0071

Datos obtenidos a partir del intervalo lineal

El límite de detección (LD) es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (Y_B) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_B), como se muestra en la siguiente ecuación:⁵³

$$LD = Y_B + 3.3 S_B$$

El límite de cuantificación (LC) es el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas y se sugiere que sea una señal igual a la del blanco (Y_B) más diez veces la desviación estándar del blanco (S_B).⁵³

$$LC = Y_B + 10 S_B$$

Donde:

Y_B : Es la ordenada de la recta (a)

S_B : Es la desviación estándar de los residuos de "y" (**$S_{y/x}$**).

De acuerdo con las ecuaciones para determinar el límite de detección y cuantificación, los datos de la **Tabla 13** se sustituyen en las fórmulas correspondientes y se obtienen los siguientes resultados:

Límite de detección

$$LD = 0.0062 + 3.3 (0.0071)$$

$$LD = 0.0296 \text{ ppm}$$

0.0296 ppm es el valor determinado para un límite de detección dentro de esta metodología.

Límite de cuantificación

$$LC = 0.0062 + 10 (0.0071)$$

$$LC = 0.0772 \text{ ppm}$$

0.0772 ppm es el valor determinado para un límite de detección dentro de esta metodología

El límite de detección y de cuantificación indican el desempeño que es capaz de cubrir el método y de acuerdo con los valores obtenidos, se observa que el método es capaz de detectar concentraciones aún más pequeñas que las concentraciones de cuantificación, lo cual indica, que las concentraciones con las que se trabajó se encuentran por arriba del límite de detección y cuantificación y puede decirse que los resultados obtenidos son aceptables.

Sesgo y recuperación

Como se mencionó anteriormente, el sesgo y el porcentaje de recobro permiten estimar errores sistemáticos inherentes, por lo que son parámetros que ayudan a evaluar la eficiencia del método al ser aplicado.

En la **Tabla 14** se presentan los valores obtenidos a partir de los datos del intervalo de trabajo para poder calcular el sesgo y el porcentaje de recuperación.

Concentración teórica adicionada	Volumen añadido (mL)		Concentración obtenida (ppm)	%Recobro	%CV	Sesgo= $C_{obtenida} - C_{teórica}$
	Abs					
0	0	0.0068	0	0	0.00	0
0.68	0.2	0.0103	0.70	103	1.69	0.02
1.36	0.4	0.0137	1.28	94	0.93	-0.08
2.04	0.6	0.0191	2.19	107	1.45	0.15
2.72	0.8	0.023	2.85	105	0.54	0.13
3.4	1	0.0253	3.23	95	0.17	-0.17

Los datos son tomados del intervalo lineal.

El porcentaje de recobro y el sesgo surgen a partir de errores que pueden ser intencionales o no intencionales, generalmente errores sistemáticos que son cometidos durante la ejecución. De acuerdo con los valores aceptables de la CCAYAC, el porcentaje de recobro debe encontrarse dentro del 90-108% con un porcentaje del coeficiente de variación menor al 3% y en cuanto al sesgo, éste debe ser lo más cercano a cero.

Al comparar los resultados obtenidos del porcentaje de recobro y sesgo, se puede observar que éstos se encuentran dentro de lo permitido, lo cual es indicativo de que los errores que se presentan no son errores proporcionales sistemáticos significativos, pero pueden ser minimizados a través de capacitaciones.

8. CONCLUSIONES

Fue posible obtener un sensor químico bajo las condiciones del laboratorio de Química Analítica. Se obtuvo el compuesto de TPP (sensor químico) y se comprobó su formación mediante las técnicas de espectroscopia de UV-Visible e Infrarrojo, donde se presentaron bandas de absorción características de esta porfirina.

Mediante espectroscopias de UV-Visible, se comprobó la formación del complejo de TPP-Cu y se propuso su estructura. Se observó el cambio en la forma y la longitud de onda de las bandas de absorción al comparar TPP no metalada y metalada.

Al evaluar los parámetros de desempeño del TPP como sensor para detectar Cu^{+2} , de acuerdo a los criterios establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), se acepta la hipótesis verdadera, ya que el método desarrollado presenta linealidad al detectar Cu^{+2} cumpliendo con el criterio de aceptación. En cuanto al intervalo de trabajo, el método presentó un coeficiente de determinación de 0.9907, indicando que existe una relación lineal entre la concentración teórica y la concentración obtenida experimentalmente. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron menores a las concentraciones utilizadas en el desarrollo del método, por lo que los resultados obtenidos son significativos y aceptables, lo cual puede ser verificado al observar que el porcentaje de recobro se encuentra dentro de los límites permitidos, indicando que los errores que el método presentó pueden ser disminuidos por medio de capacitación del personal. Estos datos se resumen en la **Tabla 15** que se presenta a continuación.

Tabla 15. *Parámetros de desempeño del método desarrollado de acuerdo a los criterios establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAAYAC)*

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultados experimentales	Cumple/No cumple
Intervalo lineal	$r^2 \geq 0.98$ IC: No debe incluir cero. Datos aleatorios en el gráfico de residuales.	$r^2 = 0.9892$ IC = 0.0059 ± 0.0045 ppm El gráfico de residuales presenta aleatoriedad en los datos en torno a cero.	Cumple
Intervalo de trabajo	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9907$	Cumple
Límite de cuantificación	Menor o igual a nivel inferior estimado en el intervalo de trabajo.	0.0072 ppm	Cumple
Límite de detección	-	0.0296 ppm	Cumple
Sesgo y recuperación	90-108%	0.68 ppm = 103% 1.36 ppm = 94% 2.04 ppm = 107% 2.72 ppm = 105% 3.4 ppm = 95 %	Cumple

9. PROPUESTAS

Para complementar el desarrollo de la metodología se sugiere determinar los parámetros de reproducibilidad, repetibilidad y robustez con el objetivo de complementar la evaluación del método.

Se realizó fluorescencia al sensor TPP, sin embargo, por motivos de la contingencia no pudieron ser completados, por lo que, se propone realizar esta técnica como una alternativa para observar si el sensor es sensible a Cu^{2+} , ya una propiedad característica de las porfirinas libres, es la intensa fluorescencia roja emitida por radiación con luz ultravioleta de longitud de onda de alrededor de 400 nm. Esta propiedad permite detectar porfirinas presentes en cantidades del orden de 10^{-8} M, de ahí que los métodos fluorimétricos ahora frecuentemente empleados para la cuantificación de porfirinas sean los más sensibles, sin embargo, sólo algunas metaloporfirinas también fluorescen, aunque con menor intensidad que las correspondientes porfirinas libres.⁵³

Para la realización de una validación, se recomienda que el desarrollo del método sea controlado con el fin de evitar o reducir los errores que puedan estar involucrados, lo cual se logra implementando en el laboratorio un sistema que controle las actividades involucradas para garantizar confiabilidad en los resultados.

Se propone realizar metodologías de este tipo como prácticas de laboratorios de enseñanza, utilizando materiales más económicos al emplear fuentes naturales de porfirinas, por ejemplo, a partir de cascarón de huevo o sangre de cordero, sin embargo, debido al tiempo de extracción de la porfirina, se adecua mejor utilizando porfirinas a partir del cascarón de huevo.

Fuentes naturales de obtención de Protoporfirina IX

La protoporfirina IX se encuentra naturalmente en los cascarones de huevo, en mayor concentración en los de color café. Una vez que es extraída, en el espectro de UV-Visible se observan bandas características y muy bien definidas de porfirinas, por lo que se esperan resultados comprometedores al utilizarla como un sensor químico. En la **Figura 25**, se muestra el espectro de absorción de UV-Visible de la protoporfirina IX obtenida del cascarón de huevo café y se puede observar que presenta una banda Soret en 405 nm, y cuatro bandas Q en 505, 540, 580 y 630 nm.

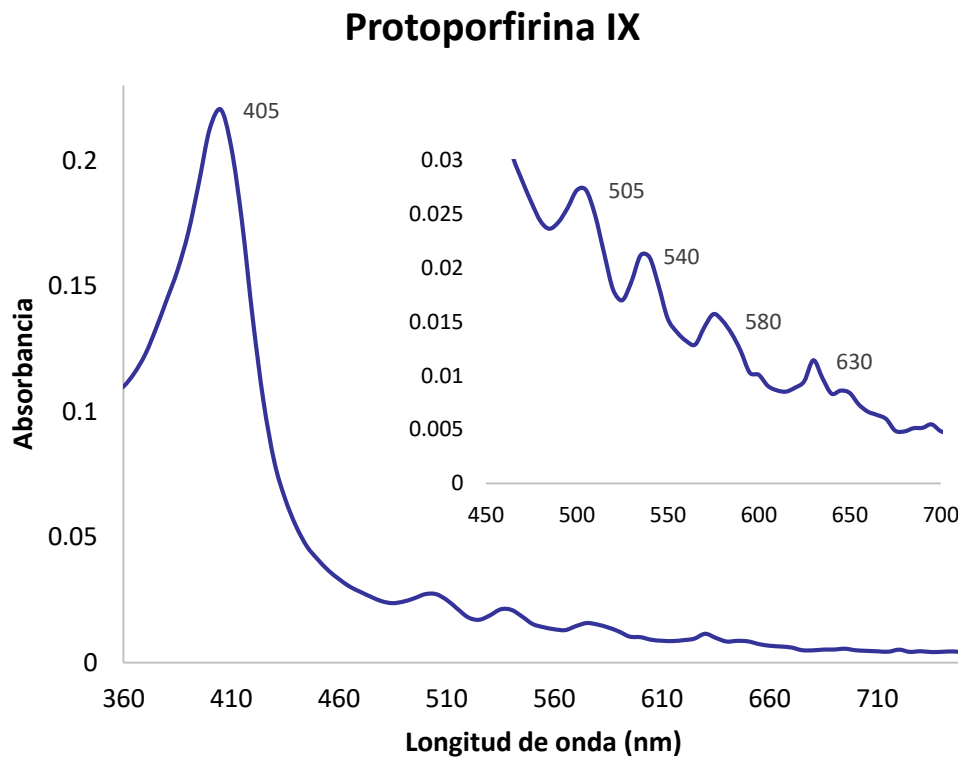
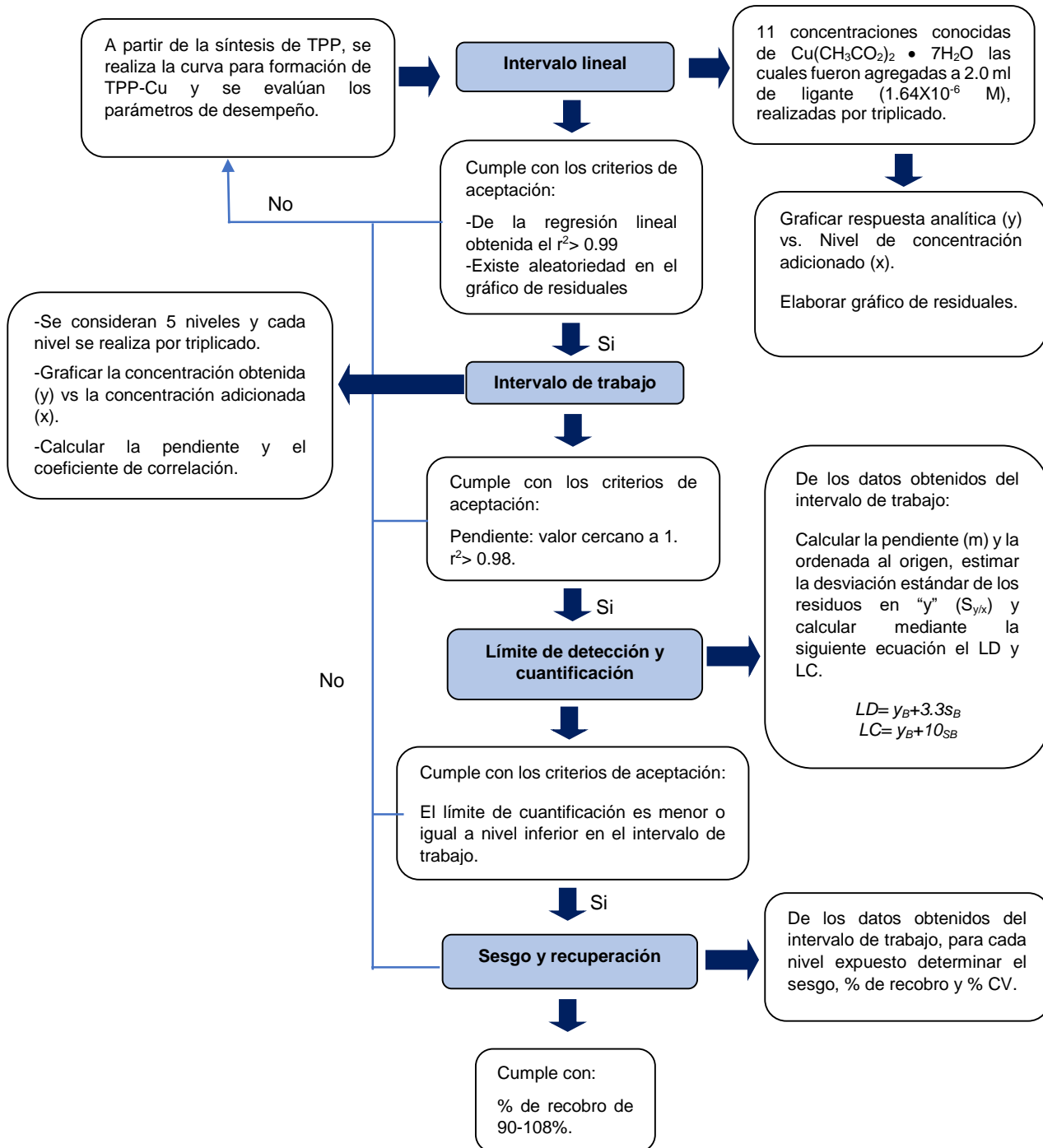


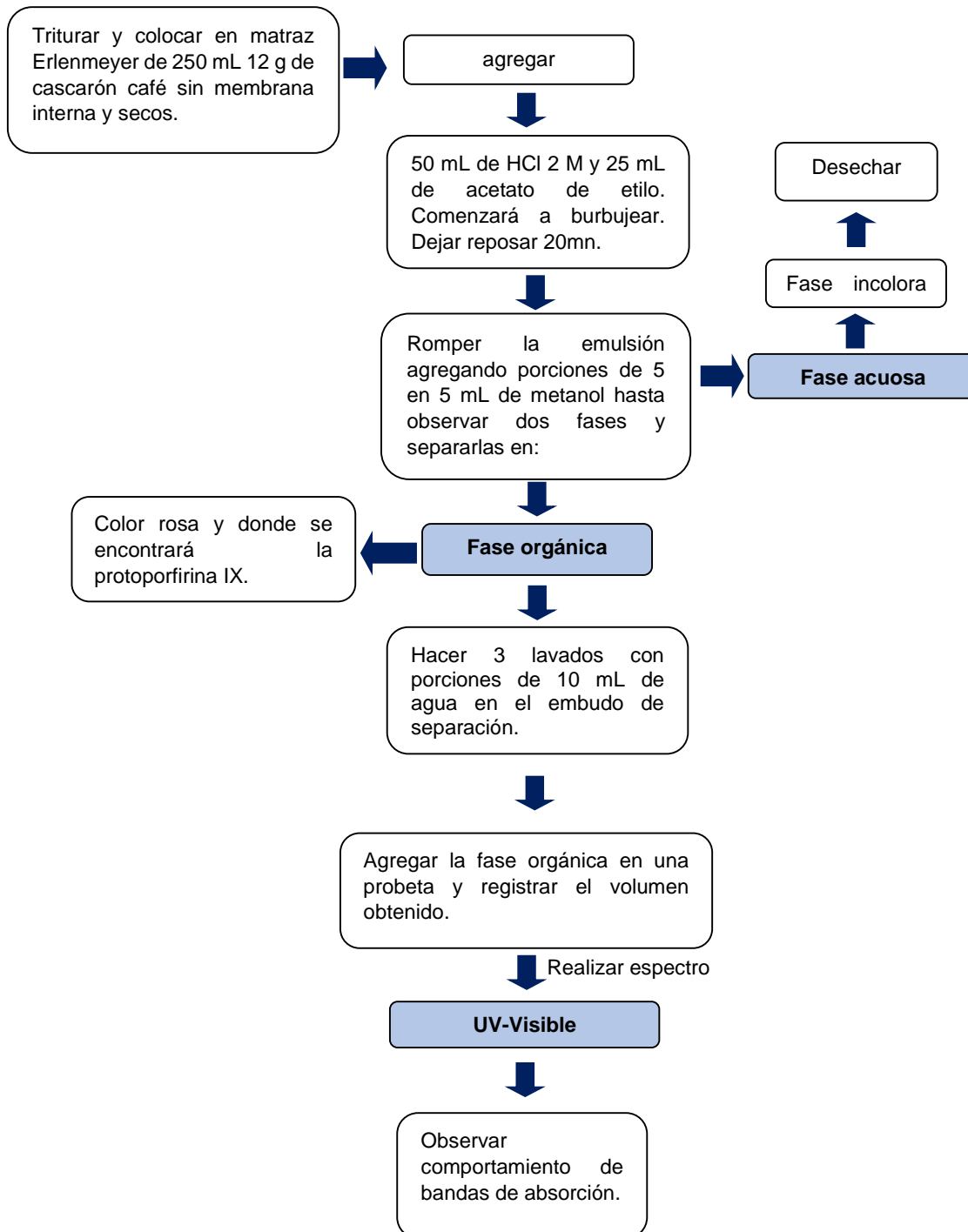
Figura 25. Espectro de UV-Visible protoporfirina IX obtenida de cascarón de huevo café.

10. ANEXOS

Protocolo de trabajo para la evaluación de los parámetros en la determinación de Cu^{2+} mediante técnica de UV-Visible.



Extracción de protoporfirina IX a partir de cascarón de huevo café.



10. Bibliografía

1. Cubeddu R, Keir WF, Ramponi R, Truscott TG. (1997) Photophysical properties of porphyrin. *Photochem Photobiol*, 46, 5, 633-638.
2. Reyes, Y.C., Vergara, I., Torres, O.E., Díaz-Lagos, M., & González, E.E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 16, 2, 66-77.
3. Londoño L. F, L. P. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14, 2, 145-15.
4. Ramírez A. (2002) Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *American College of Occupational and Environmental Medicine*, ISSN, 63, 51, 1025-5583.
5. Dougla B. D., Daniel D. H., Alexander J. J. (2005) Modelos y Conceptos de Química Inorgánica, Reverté, Segunda Edición.
6. Organización Mundial de la Salud (2019) Exposición al cadmio: un importante problema de salud pública. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329480/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.3-eng.pdf?ua=1>.
7. Ferré H. N., Schuhmacher M., Llobet J. M. y Domingo J. L. (2007). Metales pesados y salud. *Salud ambiental*, 108, 50-58.
8. Department of health and human services (2012). Toxicological profile for cadmium. Division of Toxicology and Human Health Sciences, Georgia.
9. Abadin H, Ashizawa A, Stevens (2007). Perfil toxicológico del plomo. Atlanta (GA): Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (EE. UU.). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158769/>
10. Poma, Pedro A. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69, 2, 120-126.

11. Ramírez A. (2005) El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo, Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vol. 56, pp. 57-70.
12. Valdivia M. (2005) Intoxicación por plomo. Revista Social Toxicológica Médica. 18, 1, 22-27.
13. Organización mundial de la Salud (2008) El Mercurio y la Salud. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>.
14. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 23931, Mercury. Retrieved August 9, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mercury>.
15. Bernhoft RA (2012). Toxicidad y tratamiento del mercurio: una revisión de la literatura. Revista de salud pública y ambiental. <https://doi.org/10.1155/2012/460508>.
16. Ramírez, Augusto V. (2008). Intoxicación ocupacional por mercurio. Anales de la Facultad de Medicina, 69, 1, 46-51.
17. Berlín M, Zalups RK, Fowler BA. (2007) Manual de toxicología de los metales: Mercurio. Tercera Edición, Nueva York: Elsevier.
18. Centro Nacional de Información Biotecnológica (2020). Resumen de compuestos de PubChem para CID 23978, cobre. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper>.
19. Collins, JF y Klevay, LM (2011). Cobre. Avances en nutrición. Bethesda, Md., 2, 6, 520–522. <https://doi.org/10.3945/an.111.001222>.
20. Departamento de salud y servicios humanos (2004). Cobre. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades.
21. Feoktistova L., Victorava Y. (2018) Metabolism of copper. Its consequences for human health. MediSur: Guantánamo, 16, 4, 579-587.
22. Vashchenko G., MacGillivray R. (2013) Multi-copper oxidases and iron metabolism. Nutrients, 5, 7, 2289-2313.

23. Hulanicki A., Glab S., Ingman F. (1991) Chemical sensors definitions and classification. *Pure & Appl. Chem.*, 63, 9, pp. 12247-1250.
24. Skoog Douglas A., West Donald M., Holler F. James y Crouch Stanley R. (2015) *Fundamentos de química analítica*. Novena Edición. México. CengageLearning.
25. Harris, D. C., & Lucy, C. A. (2007) *Análisis químico cuantitativo*. Tercera Edición. España. Reverté.
26. Zamadar M., Orr C., Uherek M. (2016) Water soluble cationic porphyrin sensor for detection of Hg⁺², Pb⁺², Cd⁺² and Cu⁺², *Journal of sensor*, 16, 1-8.
27. Valicsek Z., Horváth O. (2013) Application of the electronic spectra of porphyrins for analytical purposes: the effects of metal ions and structural distortions. *Department of General and Inorganic Chemistry*, 107, pp. 47-62.
28. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002) *Chemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman.
29. Fleischer E. B. (1969) The structure of porphyrins and metalloporphyrins, *Department of Chemistry, Chicago*, 3, pp. 105-112.
30. Martín T. R. (2015) Autoensamblaje de derivados de compuestos de Ru(II) con deuteroporfirina-IX sobre oro, la Habana, 1-123.
31. Pañuela A. (2005) *Hemoglobina: Una molécula para el investigador*. Corporación médica del Valle, Colombia, 36, 215 - 225.
32. Vera L. (2010) *Hemoglobina: Una molécula prodigiosa*. *Ciencias Exactas Fisiológicas*, Valencia, 1, 213-232.
33. Stevenson, DK y Wong, RJ (2010). Metaloporfirinas en el tratamiento de la hiperbilirrubinemia neonatal. *Seminarios de medicina fetal y neonatal*, 15 (3), 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.11.004>.
34. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002) *Chemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman.
35. Metin A y Akins D. (2016) Geometric and Electronic Properties of Porphyrin and its Derivatives. *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*. doi: 10.5772 / 64583

36. Weininger, S. J., & Stermitz, F. R. (1988). Química orgánica. Barcelona: Reverté.
37. Department of Chemistry (1996) Microscale Synthesis and Electronic Absorption Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin H₂(TPP) and Metalloporphyrins ZnII(TPP) and NiII(TPP). Journal of Chemical Education, 73, 12, 1188-1200.
38. Gary D. Christian (2009) Química Analítica. Sexta Edición. México. McGraw-Hill Education.
39. Dolphin, D. (2014). *The Porphyrins V3: Physical Chemistry, Part A*. Saint Louis: Elsevier Science.
40. Morillas, P. P. y. c. Guía Eurachem (2016) La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Eurolab España, 60.
41. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (2005) Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de alimentos en América del Sur, pp. 1-85.
42. NMX-EC-17025-IMNC-2018. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5534255&fecha=09/08/2018.
43. Chica M. O., (2007) Validación de métodos analíticos en aguas, Medellín, pp. 1-35.
44. NMX-AA-051-SCFI-2016. Análisis de agua-Medición de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas-Método de prueba.
45. Huber, W. (2004), On the use of the correlation coefficient r for testing the linearity of calibration functions, Accreditation and Quality Assurance, 9, 726.
46. Standing Committee for Quality and Competence (QC) (2006), Validation and Implementation of Methods, QCC-VAL-001, Issue No. 001.
47. Criterios para la evaluación de métodos fisicoquímicos (2011) Guía CCAYAC, pp. 1-20.

48. Fisicoquímica ambiental (2006) Estandarización de métodos analíticos, pp. 1-20.
49. Guideline for Industry (1995) Validation of Analytical Procedures: ICH-Q2Q.
50. Alder, A. (1966). *A Simplified for meso-Tetraphenylporphin*. R.C.A Laboratories, Princeton, New Jersey, Vol. 32, p. 176.
51. Kim H. Y. (2019). Statistical notes for clinical researchers: simple linear regression 3 - residual analysis. *Restorative*, 44(1).
52. Schneider, A., Hommel, G., & Blettner, M. (2010). Linear regression analysis: part 14 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Arzteblatt international*, 107(44), 776–782. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0776>.
53. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods (2016) ONODC: Viena.
54. Prabpal J. Vilaivan T., Praneenararat T. (2017) Paper-Based heavy metal sensors from the concise synthesis of an anionic porphyrin: A practical application of Organic Synthesis to Environmental Chemistry, *J. Chem. Educ.*, 94, 1137-1142.