

# METODOS ANALÍTICOS

## Clasificación

Los métodos analíticos se clasifican con frecuencia en

- *Métodos clásicos*
- *Métodos instrumentales.*

## Métodos clásicos

En los comienzos de la química, la mayor parte de los análisis se ejecutaban separando los componentes de interés que se encontraban en una muestra, mediante precipitación, extracción o destilación.

En el caso de los análisis *cualitativos*, los componentes separados se trataban después con reactivos que originaban productos que se podían identificar por su color, por sus temperaturas de ebullición o de fusión, sus solubilidades en una serie de disolventes, sus olores, sus actividades ópticas o por sus índices de refracción. En el caso de los análisis *cuantitativos*, la cantidad de analito se determinaba mediante mediciones *gravimétricas* o *volumétricas*.

En las mediciones gravimétricas se determinaba la masa del analito o de algún compuesto producido a partir de él. En los procedimientos volumétricos, también llamados *titulométricos*, se medía el volumen o la masa de un reactivo estándar necesario para reaccionar por completo con el analito.

Estos métodos clásicos para separar y determinar analitos se usan todavía en muchos laboratorios. Sin embargo, el grado de su aplicación general está disminuyendo con el paso del tiempo y con el surgimiento de métodos instrumentales para reemplazarlos.

## Métodos instrumentales

A principios del siglo XX, los científicos empezaron a explotar fenómenos distintos de los usados en los métodos clásicos para resolver problemas analíticos. Por tanto,

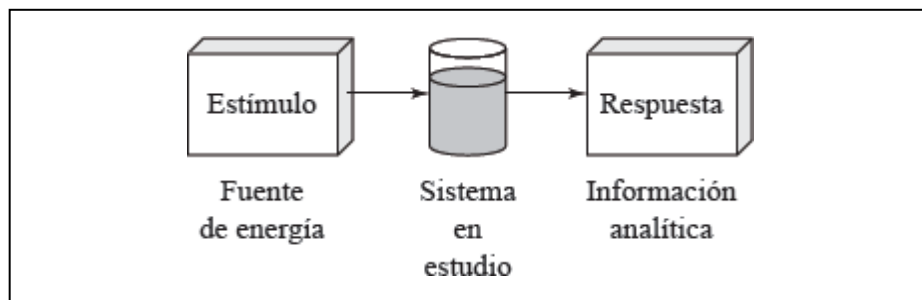
la medición de propiedades físicas del analito, tales como conductividad, potencial de electrodo, absorción de la luz o emisión de la luz, relación masa/carga y fluorescencia empezaron a usarse en el análisis cuantitativo. Además, técnicas cromatográficas y electroforéticas muy efectivas empezaron a reemplazar la destilación, la extracción y la precipitación para la separación de componentes de mezclas complejas antes de su determinación cualitativa o cuantitativa. Estos métodos más recientes para separar y determinar especies químicas se conocen como *métodos instrumentales de análisis*.

Muchos de los fenómenos sobre los que se apoyan los métodos instrumentales se han conocido desde hace un siglo o más. Sin embargo, su aplicación por parte de la mayoría de los científicos se retrasó por la carencia de instrumentos confiables y sencillos. De hecho, el desarrollo de los modernos métodos instrumentales de análisis es paralelo al desarrollo de la electrónica y la industria de la computación.

### **INSTRUMENTOS UTILIZADOS EN QUÍMICA ANALÍTICA**

Un instrumento para análisis químico convierte la información acerca de las propiedades físicas o químicas de un analito en datos, que luego puede manipular e interpretar el operador. Por lo tanto, un instrumento analítico se puede considerar como un dispositivo de comunicación entre el sistema en estudio y el investigador.

Para obtener la información deseada del analito, es necesario proporcionar un estímulo, generalmente energía electromagnética, eléctrica o térmica, como se ilustra en la Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama en el que se muestra el proceso global de una medición con instrumentos.

El estímulo extrae una respuesta del sistema en estudio cuya naturaleza y magnitud

están regidas por las leyes fundamentales de la química y la física. La respuesta instrumental, también es llamada señal analítica.

## CALIBRACIÓN

La palabra calibración puede implicar dos facetas diferentes:

- **calibración instrumental**
- **calibración metodológica**

En la práctica estos dos tipos de procesos muchas veces se confunden, aunque representan dos aspectos diferentes y complementarios que son claves de la trazabilidad química.

La **calibración instrumental** o de equipos se refiere al aseguramiento de que un instrumento y/o aparato funcione correctamente. Su objetivo es corregir la respuesta instrumental hasta alcanzar el valor considerado como verdadero que lleva implícito el estándar utilizado.

Por otro lado, la **calibración metodológica analítica** es la caracterización de la respuesta de un instrumento en función de las propiedades de un analito o de un grupo de ellos. Se basa en el establecimiento de una relación inequívoca entre la señal instrumental y la concentración del analito. Por lo tanto, tiene un significado fundamental cuantitativo, si bien puede tener connotaciones cualitativas.

Según la técnica analítica involucrada, la calibración tiene diferentes aproximaciones. En gravimetría (método absoluto), solo se calibra la balanza. En volumetría (método estequiométrico) se calibra la bureta y se emplea un patrón primario o secundario previa valoración. En fotometría se calibra el fotómetro y se establece la relación absorbancia concentración para cada proceso de medida químico.

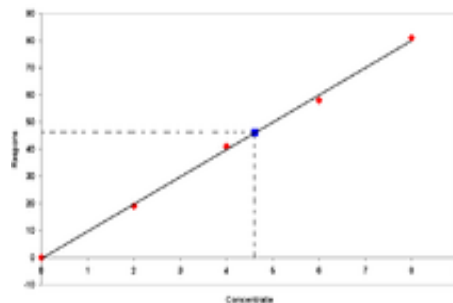
### CALIBRACIÓN METODOLÓGICA

Pueden considerarse dos tipos de métodos para la cuantificación de analitos,

métodos relativos o absolutos. De acuerdo al tipo de método se consideran diferentes procedimientos de calibración:

**a) Procedimientos absolutos;** Relacionar la señal del instrumento con una magnitud física y coloca la marca o escala del aparato en la posición correcta respecto al resultado de la calibración. Ejemplos de ajuste de equipos: Calibrar una balanza o calibrar una pipeta.

**b) Procedimientos relativos:** Se establece una función de calibración aplicando el mismo procedimiento de medida a *patrones* y a *muestras*. La relación es una *función matemática* que permite establecer la **relación entre señal y concentración**. Ejemplo: Relación de regresión entre la **señal instrumental (y)** y la **concentración (x)**, mediante un modelo linealpolinómico de grado 1.



**Figura 2.** Curva de calibrado

## SEÑAL ANALÍTICA O RESPUESTA INSTRUMENTAL

### MEDICIÓN DE LA RESPUESTA

Para la medición de la respuesta instrumental es necesario seguir una serie de pasos, como se explica a continuación:

#### 1. Preparación de la curva de calibrado.

Se preparan soluciones patrón (estándares) del analito de interés (cinco niveles de concentración como mínimo), a partir de drogas patrón primario o secundario, y un blanco (concentración = 0).

Estas soluciones tendrán concentraciones crecientes, equi-espaciadas entre cero y

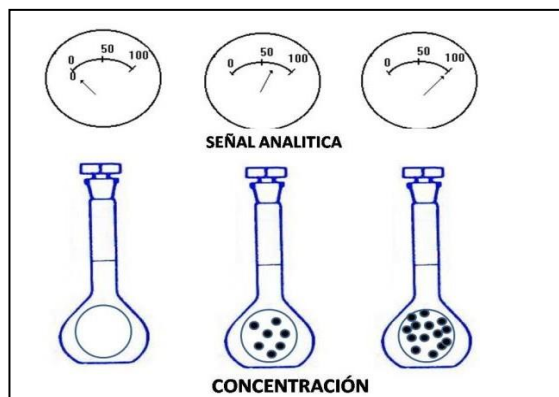
el extremo superior del rango de concentraciones de trabajo. Cada patrón se procesa usualmente por triplicado (y también el blanco).

Debe ponerse especial cuidado en la preparación de los patrones del analito para la calibración, de manera que las *concentraciones de calibrado* se conozcan con la *máxima precisión* posible (debe trabajarse con material de vidrio calibrado).

Este requisito se relaciona con el hecho de que las señales analíticas que se grafican sobre el eje y (variable dependiente) asumen todos los errores del procedimiento y las concentraciones que se grafican sobre el eje x (variable independiente), no asumen error.

## 2. Medición de las señales analíticas.

Como se muestra en la Figura 3, a cada patrón le corresponde un valor en el aparato de lectura.



**Figura 3.** Relación entre la concentración de un analito y la señal que produce en el instrumento.

## 3. Ordenamiento de los datos

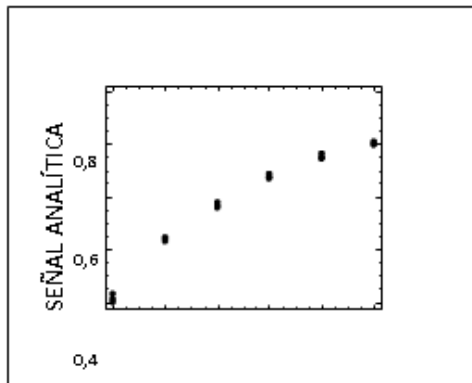
Concentración	Señal analítica
0	0,030
0	0,080
0	0,020
1	0,233

1	0,298
1	0,275
..	...

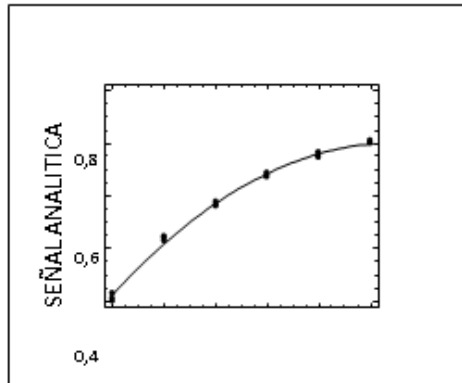
#### 4. Estudio de la respuesta.

##### a)-Construcción de un gráfico: señal analítica vs concentración.

En primer lugar, se grafican los puntos, se estudian visualmente, y si es posible se los une con una línea(recta o curva), como se describe en las Figuras 4 y 5.



**Figura 4.** Relación gráfica entre los datos de concentración de un analito y su señal instrumental.



**Figura 5.** Estimación de una línea que se ajuste a los datos experimentales.

##### b)-Estudio de los rangos de la curva.

En la mayoría de los casos las curvas de calibrado se dividen en tres regiones (Figura 6), denominadas:

- i. Rango Lineal: zona lineal de la curva, presente a bajas concentraciones. Su límite inferior se corresponde con el Límite de Cuantificación (LOQ, *Limit of Quantification/Quantitation*).
- ii. Rango dinámico: Se considera que va desde la menor concentración detectable hasta la pérdida de relación entre respuesta y concentración, es decir, abarca el rango lineal y la región donde la recta se transforman en una curva. Su límite inferior se corresponde con el Límite de Detección (LOD, *Limit of Detection*).
- iii. Pérdida de la relación entre respuesta instrumental y concentración: Región

donde la concentración es demasiado elevada y se pierde la relación con la respuesta instrumental, es decir que por más que se siga aumentando la concentración, la señal analítica permanece constante.

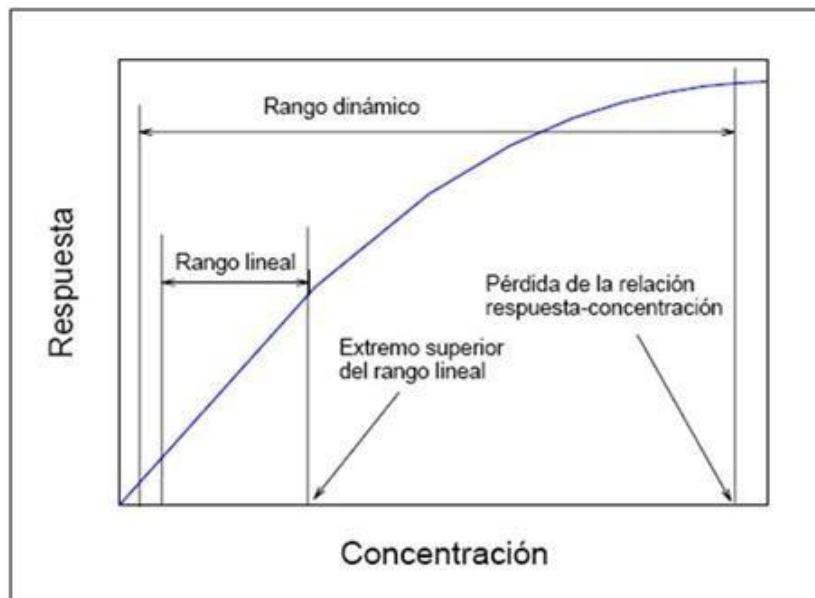


Figura 6. Rangos en una curva de calibrado.

La región de pérdida de la relación “respuesta instrumental-concentración” no puede utilizarse para cuantificar, ya que no aporta información debido a que *no existe relación entre la señal analítica y la concentración* ( $r \rightarrow 0$ ). Dicha zona se descarta.

En el rango dinámico se puede cuantificar gráficamente o en el caso de disponer de un software que permita realizar una regresión exponencial, logarítmica o polinómica, puede también cuantificarse mediante dicha ecuación matemática.

El rango lineal es el de elección para la cuantificación por las siguientes razones:

- a. Cuando las concentraciones son altas ocurren interacciones (choques) entre las moléculas del analito que se quiere cuantificar. Esta es una de las causas por la que las curvas de calibrado a concentraciones mayores se desvían. Siempre es preferible trabajar cuando las moléculas se comportan como entes independientes.
- b. Una de las propiedades que debe cumplir un transductor o detector es tener una

respuesta constante en un amplio intervalo de longitudes de onda y que responda de manera lineal frente al incremento del número de moléculas en solución.

c. Para el cálculo, siempre es más fácil predecir una concentración con una ecuación de primer orden y no superior, ya que al ser lineal se puede ajustar con una ecuación simple ( $y = Ax + B$ ).

### c. Estudio de la linealidad.

Existen diferentes maneras para evaluar la linealidad de una de curva de calibrado, algunas de ellas:

#### 1. Gráficamente:

- a. Curva de calibrado: señal analítica vs concentración
- b. Gráfico de los residuos ( $e$ )

#### 2. Pruebas estadísticas F:

- a.  $F = (S_{fit})^2 / (S_y)^2$
- b.  $F = S_{fit}^2 / s^2$
- c. Análisis de la varianza residual  $F = MS_{lof} / MSe$

Todo analista, antes de proceder a realizar un análisis cuantitativo, debe asegurarse de que exista una relación de dependencia entre la variable independiente ( $x$ , concentración) y la variable dependiente ( $y$ , respuesta instrumental), para lo cual debe realizar un estudio estadístico de los datos.

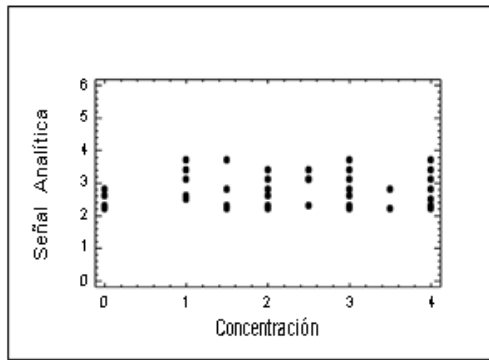
## 5- Correlación

La correlación es una medida de la asociación entre dos variables. Cuando existe correlación, los valores a lo largo de las dos variables están ligados entre sí de algún modo, de forma que una variable proporciona información sobre la otra.

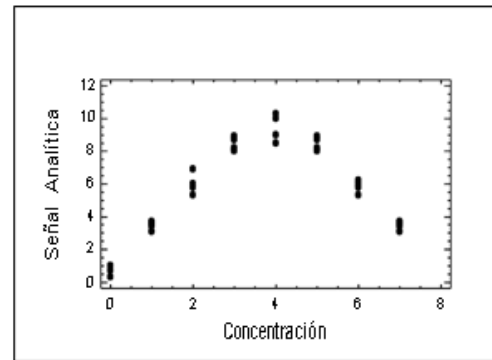
La asociación entre variables se estima mediante la covarianza y el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ).

En la Figura 7 se muestran 4 casos diferentes:

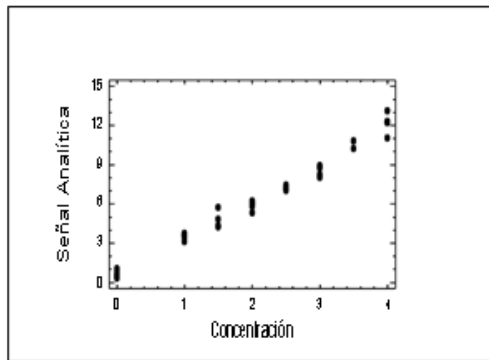




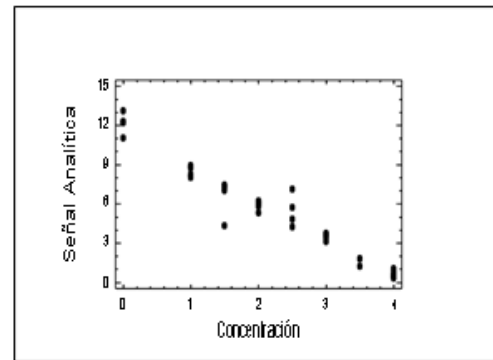
(A)



(B)



(C)



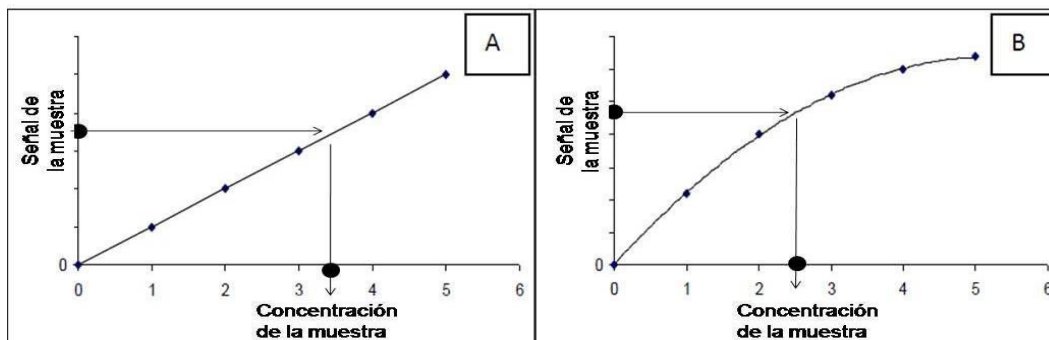
(D)

- (A). No existe relación entre Concentración y Señal Analítica,  $r \rightarrow 0$ .  
 (B). Existe relación parabólica entre Concentración y Señal Analítica, a pesar de esta relación  $r \rightarrow 0$ .  
 (C). Existe relación creciente entre Concentración y Señal Analítica,  $r \rightarrow 1$ .  
 (D). Existe relación decreciente entre Concentración y Señal Analítica,  $r \rightarrow -1$ .

## 6- Cuantificación

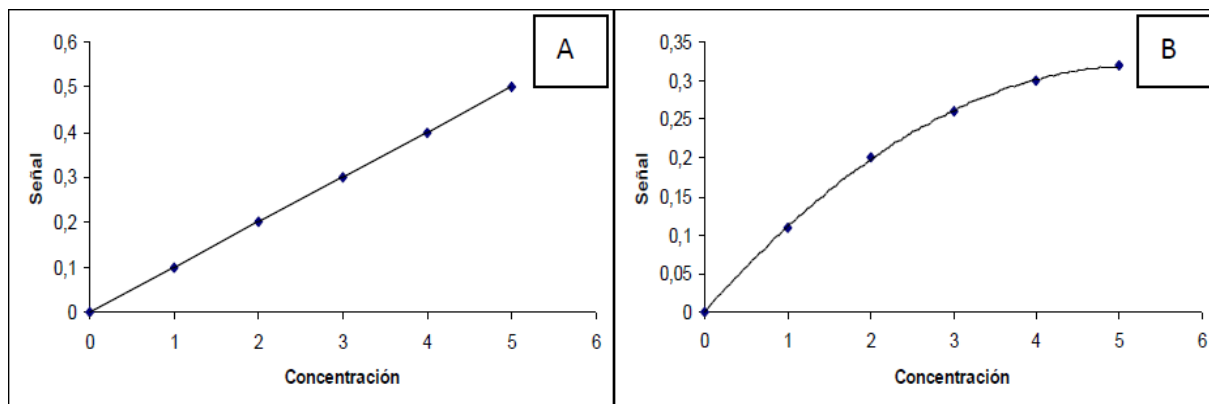
Consiste en la predicción de la concentración del analito en la muestra incógnita y puede efectuarse de dos maneras:

- a) **Cuantificación gráfica.** Obtener la concentración del analito en la muestra ingresando en la curva de calibrado, sea esta una recta o no, con el valor de "Señal de la muestra" e interpolando. (Figura 8)



**Figura 8. Cuantificación gráfica.** Representación de la forma en la que se puede cuantificar gráficamente, sea la curva de calibrado una recta o no.

b) **Cuantificación matemática.** Luego de realizar la gráfica de la curva de calibrado, se observa que tipo de función matemática ajusta mejor la distribución de los datos.



**Figura 9. Curvas de calibrado.** En la figura A se representa una curva de calibrado que puede ser ajustada mediante la ecuación de una recta. En B, la curva es ajustada con una ecuación polinómica.

Los datos pueden estar distribuidos de tal manera que formen una recta, pudiéndose obtener por regresión lineal una relación entre la señal analítica y la concentración.

$$y = Ax + B \longrightarrow \text{Señal Analítica} = k \cdot \text{Concentración}$$

Dónde:

B: Ordenada al Origen

A: Pendiente

Se reemplaza el valor de  $y$  por el valor de la señal de la muestra (si esta se procesó por duplicado o triplicado: su promedio) mediante el cálculo se obtiene el valor de  $x$  (concentración del analito en la muestra).

En el caso de no ser una recta, puede obtenerse una relación mediante una ecuación que ajuste a la curva, como pueden ser regresiones polinómicas, exponenciales, logarítmicas, etc.

$$y = a + b \cdot x + c \cdot x^2 \longrightarrow \text{Señal Analítica} = b \cdot C + c \cdot C^2$$