

CIENCIA 21(1), 14 - 24, 2013
Maracaibo, Venezuela

Desarrollo de un método rápido por inyección en flujo para la determinación de cobre en suero sanguíneo

Blanca Irene Semprún de Villasmil^{1}, Ana Beatriz Cáceres²,
Denny Rigoberto Fernández Torres³, Gusdanis Alberto Campos²,
Homero Antonio Pérez Pedrozo² y Víctor Alberto Granadillo Morán³*

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina.

²Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos (LDMA),

³Laboratorio de Instrumentación Analítica (LIA). Facultad Experimental de Ciencias.
Universidad del Zulia. Maracaibo 4011, Venezuela.

Recibido: 12-05-11 Aceptado: 19-02-13

Resumen

Se presenta un método analítico rápido y sencillo para la determinación espectrométrica UV-Vis de Cu (II) en suero sanguíneo por análisis de inyección en flujo (FIA). El 1-(2-piridilazo)-2 naftol (PAN) ($2,0 \times 10^{-4}$ mg L⁻¹) se empleó como acomplejante y NH₄Cl/NH₄OH como solución amortiguadora a pH 9,5. Se utilizaron tuberías de PVC de 0,5 mm di. El volumen de muestra y la longitud del reactor optimizados son: 183 µL y 2 m, respectivamente, con un caudal de 1 mL/min. La absorción del complejo PAN-Cu (II) se midió a 555 nm. Se obtuvo un intervalo de trabajo, L_D (definido 3σ_b) y el L_C (definido 10σ_b) de: 0,2-12,0 mg L⁻¹, 0,06 mg L⁻¹ y 0,2 mg L⁻¹, respectivamente. La precisión (DER) fue de 3,87% y la exactitud se evaluó comparando los resultados obtenidos por UV-Vis con la espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS) y no se encontraron diferencias significativas empleando la prueba t-student. Se obtuvieron concentraciones promedios de Cu (II) (mg L⁻¹ ± DE) en suero sanguíneo humano de: 1,5 ± 0,18 (FAAS) y 1,5 ± 0,20 (método propuesto). El método desarrollado para Cu es reproducible, exacto, con buenos límites de detección y cuantificación y amplio rango dinámico. Este método permite analizar 38 muestras por hora.

Palabras clave: absorción molecular, análisis por inyección en flujo, cobre, PAN y suero sanguíneo.

Development of a rapid method for flow injection determination of copper in blood serum

Abstract

A fast and simple analytical method for UV-Vis spectrometric determination of Cu (II) in blood serum is presented using flow injection analysis (FIA). The 1-(2-pyridylazo)-2 naphthol (PAN) ($2,0 \times 10^{-4}$ mg L⁻¹) was used as complexing and NH₄Cl/NH₄OH as buffer at pH 9.5. It was used PVC pipes of 0.5 mm id. The sample volume and length of the reactor were optimized: 183 µL and 2 m, respectively, with a flow rate of 1 mL/min. The absorption of the complex PAN-

* Autor para la correspondencia: blansenirene@gmail.com

Cu (II) was measured at 555 nm. It was obtained the working range, L_D (defined as $3\sigma_b$) and L_Q (defined as $10\sigma_b$) of 0.2 to 12.0 mg L⁻¹, 0.06 mg L⁻¹ and 0.2 mg L⁻¹, respectively. Precision (RSD) was 3.32% and accuracy was assessed by comparing the results obtained by UV-vis and flame atomic absorption spectrometry (FAAS), using t test no significant differences were found. The average concentrations obtained from Cu (II) (mg L⁻¹ ± SD) in blood serum were: 1.5 ± 0.18 (FAAS) and 1.5 ± 0.20 (proposed method). The method developed for Cu was reproducible, accurate, with good detection and quantification limits and wide dynamic range. This method allows the analysis of 38 samples per hour.

Keywords: blood serum, cooper, flow injection analyses, molecular absorption, PAN.

Introducción

El cobre (Cu) es un metal esencial que actúa como co-factor en la formación de numerosas enzimas (1) tales como: superóxido dismutasa, lisil oxidasa, citocromo c oxidasa y ceruloplasmina (2), las cuales cumplen funciones vitales importantes en el cuerpo humano (1). Además, el Cu participa en la síntesis de la hemoglobina, en la respuesta inmune del organismo y está relacionado con la función neurotransmisora del cerebro (3). Sus valores de referencia son: 0,71-1,4 mg L⁻¹ en el hombre y 0,8-1,55 mg L⁻¹ en la mujer (3, 4). Se ha reportado que la deficiencia y niveles elevados de este metal en el organismo humano conlleva a la aparición de numerosas enfermedades (5, 6). De allí la importancia en la determinación y cuantificación del cobre en diferentes fluidos biológicos humanos (e.g., suero sanguíneo, sangre completa y orina, entre otros). En tal sentido, muchas técnicas han sido reportadas para la determinación de cobre en suero sanguíneo, tales como: ETA-AAS (7), ICP-AES (8), FAAS (9) y espectrométricas (MAS-UV-vis) (10), entre otras. Las técnicas FAAS y ICP-AES son las técnicas más empleadas para la determinación de cobre debido a su selectividad y sensibilidad; sin embargo, requieren de personal entrenado para el manejo de los equipos, y la adquisición, el mantenimiento y los insumos de los equipos son costosos (11).

La espectrometría UV-vis es una técnica alternativa que permite realizar la determinación de cobre. Muchos métodos analíti-

cos se basan sobre esta técnica, debido a la rapidez, simplicidad y multiplicidad de aplicaciones (12). Sin embargo, siendo una técnica accesible y común en la mayoría de los laboratorios de análisis, resulta difícil su utilización para la determinación de Cu (II) en suero sanguíneo humano, ya que el analito con los complejante naturales de esta matriz forma especies no absorbentes (12). Muchas de las especies no absorbentes se determinan mediante esta técnica al hacerlas reaccionar con agentes formadores de complejos para obtener productos que absorben en las regiones ultravioleta y visible (12). Dentro de los métodos analíticos para la determinación espectrométrica UV-Vis de cobre, los más comunes se basan en la formación de complejos (complejometría). Los reactivos más empleados para la formación de complejo son de origen orgánico; tales como el 5-(4-sulfofenilazo)-8-aminoquinolina (SPA) (13) dietilditiocarbamato (DDTC) (14), 1,5-difenil-benzoína (cuprón) (15), 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batocuproína) (16, 6), azul de metiltimol (17), 1,10 fenantrolina (18), 1-piridilazo, 2-naftol (PAN) (11), ácido bicinconínico (19), biquinolina (20) y 2,6-diacetilpiridina bis-4-fenil-3-tiosemicarbazona (2,6-DAPBPTSC) (10), entre otros. En la mayoría de los métodos que involucran el uso de los reactivos reportados y descritos anteriormente, requieren de procedimientos complejos tales como; resina de intercambio iónico para concentrar el metal, agente surfactante para solubilizar el complejo formado, tratamiento de muestras como diges-

tión, mineralización y desproteización, entre otros.

Existen reportes actualizados de métodos desarrollados para la determinación de cobre (9,11,12,16-20) mediante complejometría; sin embargo, no hay trabajos publicados con sistemas FIA para la determinación directa de cobre en muestras de suero sanguíneo humano (matriz de elevada complejidad), excepto Teshima y col. (21), quienes reportaron un método espectrofotométrico por FIA para determinar simultáneamente cobre, hierro y cinc en suero sanguíneo humano, empleando el reactivo nitro-PAPS como agente complejante. Las desventajas que presenta este método son: (i) las muestras de suero sanguíneo se desproteizaron con una mezcla de ácido clorhídrico y tricloroacético, luego se centrifugaron y calentaron a 90°C por 30 min; (ii) el sistema FIA diseñado necesitó de: tres micro bombas dual, un degasificador, un sistema para el control de temperatura, una celda de flujo de multicompartimento (celda de flujo cuádruple), lo cual lo hace muy complejo, inaccesible, costoso y laborioso para el uso en los laboratorios clínicos.

Por lo tanto, resulta novedoso el desarrollo de un método analítico rápido y sencillo para la determinación espectrofotométrica

ca en la región visible de Cu (II) en suero sanguíneo humano por análisis de inyección en flujo (FIA), empleando el 1-(2-piridilazo)-2-naftol como el agente formador del complejo. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos por el método basado en las técnicas analíticas ya establecidas y más tradicionales como la FAAS.

Materiales y métodos

Equipos

Para la determinación analítica de Cu (II) se usó un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu, espectrofotómetro de absorción atómica marca PerkinElmer modelo 2380; en el modo de llama (FAAS), una válvula de inyección de 6 vías (marca Rheodyne), una bomba peristáltica modelo Minipuls Evolution (Marca Gibson), una centrifuga Herml. Z 232 MK II, agitador Vortex-Genie, modelo K-500-G (Fisher Scientific), una balanza Analytical Plus (precisión $\pm 0,00010$ g) y tuberías y conectores de PVC de 0,51 mm de diámetro interno (di). El sistema FIA empleado para la determinación de Cu (II) en suero sanguíneo se muestra en la figura 1.

Reactivos

Se emplearon reactivos de grado analítico. Las soluciones concentradas de Cu (ca.

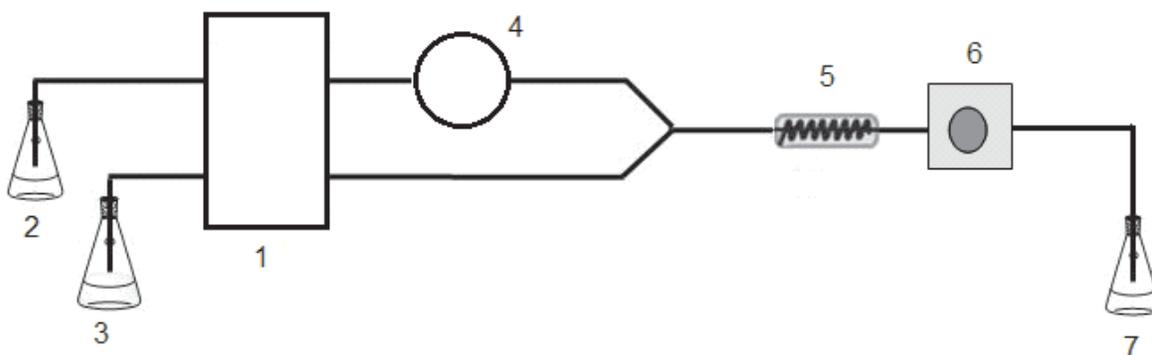


Figura 1. Diagrama del sistema en línea diseñado para la determinación de Cu^{2+} en suero sanguíneo humano. 1) Bomba peristáltica con tubería de bomba de 0,51 mm d.i.; 2) Solución amortiguadora: $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (pH 9,5); 3) Reactivo complejante: PAN 2×10^{-4} M; 4) Válvula de inyección de seis puertos; 5) Reactor de TEFLÓN 0,5 mm diámetro interno; 6) Celda de flujo continuo/ Detector de absorción molecular UV-Visible de longitud de onda variable; 7) Desecho.

1000 mg L⁻¹) se prepararon a partir de una solución concentrada comercial (e.g., Titrisol, Merck, Alemania). Las soluciones patrones de las curvas de calibración se prepararon diariamente, utilizando un intervalo de concentraciones de 0,2-6 mg L⁻¹ para la curva de trabajo o calibración. Todas las soluciones de trabajo se prepararon con agua desionizada grado I ASTM (22), en ácido nítrico 0,01 M. El agente formador de complejo utilizado fue el PAN (Hopkin & Williams, Inglaterra), la solución amortiguadora de NH₄Cl/NH₄OH a 0,1 M (Riedel-de Haën, Germany) y el ácido sulfúrico 1 M (H₂SO₄, Fluka 99%).

Muestreo y tratamiento

La población bajo estudio estuvo conformada por mujeres y hombres mayores de 18 años. Se tomaron 10 mL de sangre completa y se colocaron en tubos de polipropileno, una vez formado el coágulo se centrifugaron a 1500 rpm por 20 minutos, separando el suero en un tubo de polipropileno limpio. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta el momento del análisis.

Previo al análisis, las muestras de suero sanguíneo se diluyeron 10 veces con agua desionizada. Cada porción de prueba se preparó por triplicado y las lecturas de absorbancia de Cu-PAN se registraron por pentuplicado.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos y posterior análisis, se realizó un análisis de

significancia empleando la prueba *t-student* (23), la cual permitió comparar los resultados del método analítico propuesto (FIA/UV-Vis) con los obtenidos utilizando un método de referencia (FAAS).

Resultados y discusión

Formación del complejo Cu-PAN

La reacción que origina el complejo Cu-PAN se puede considerar como una reacción ácido-base de Lewis, en la cual el 1-(2-piridilazo)-2-naftol actúa como base y el Cu²⁺ como ácido (figura 2) en condiciones de pH básico (24).

Parámetros de reacción

Optimización de la longitud de onda de trabajo. Para iniciar el desarrollo metodológico del cobre se tomaron como base 2 parámetros previamente reportados en la literatura: concentración del PAN por debajo de 0,1 mmol L⁻¹, y una solución amortiguadora (NH₄OH/NH₄Cl) con un pH de 9,0; para favorecer la formación del complejo metal-PAN (11).

Inicialmente, se midieron los espectros de absorción de la solución de PAN y del complejo formado para conocer la longitud de onda de máxima absorción. Como se observa en la figura 3(a), el complejo Cu-PAN presenta una intensa señal entre 500 y 600 nm con un máximo a 541 nm y al compararlo con la figura 3(b) del espectro del reactivo PAN, la banda de absorción del complejo se

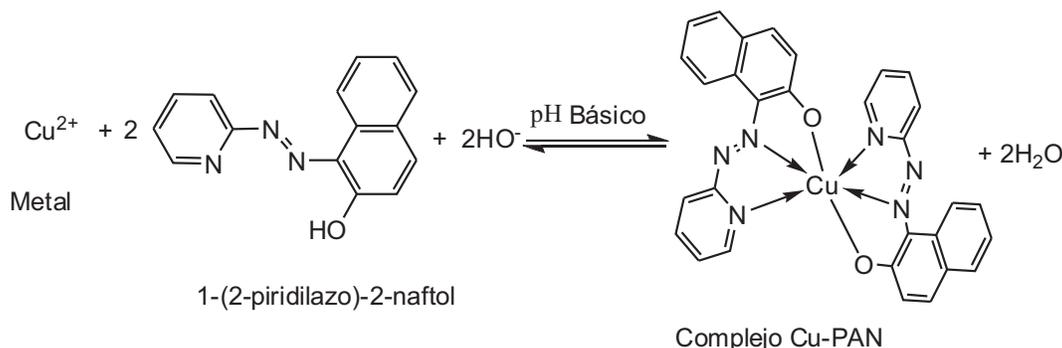


Figura 2. Reacción de Formación del Complejo Cu-PAN.²⁸

encuentra en una región distante (visible) debido a que la misma se debe a las bandas de transferencias metal-ligando en la zona visible del espectro (25), mientras que la del ligando es propia de los grupos que los constituyen. Este hecho garantiza que el exceso del PAN no interfiere en la medición analítica en la región de 500 a 600 nm. De forma de evaluar en detalle la señal del complejo formado en el sistema continuo. Se midió el espectro de absorción en un espectrofotómetro de absorción molecular con dispositivo de diodos. La figura 4 muestra como la señal a 555 y 541 nm se superponen mostrando una igual intensidad mientras que la señal a 433 nm (correspondiente al PAN) práctica-

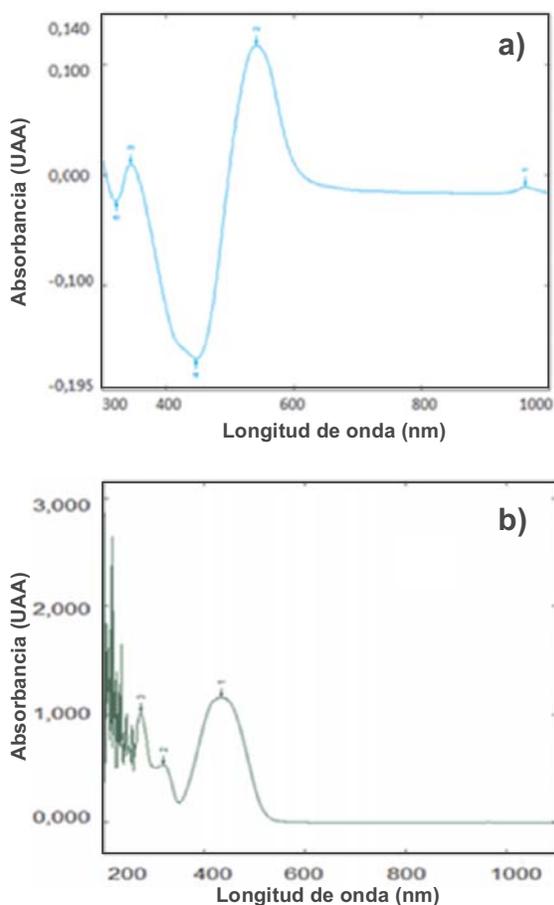


Figura 3. Espectro de absorción del complejo Cu-PAN (a) y del reactivo complejante (PAN) (b).

mente desaparece debido a la formación del complejo y por ende el consumo del reactivo complejante; empleando el sistema FIA con una solución de PAN 2×10^{-4} M y con una solución amortiguadora de hidróxido de amonio/cloruro de amonio ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) a pH = 9,0. Se comparó la señal obtenida a 545, 550, 555, 560 y 565 nm. En la figura 5 se puede observar que la señal más intensa se logró a 555 nm. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Agnihotri y col. (24), quienes emplearon una longitud de onda de 555 nm y $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ a pH 9,5 en un sistema manual para la determinación de cobre en muestras biológicas (cabello humano, e hígado), bebidas alcohólicas y

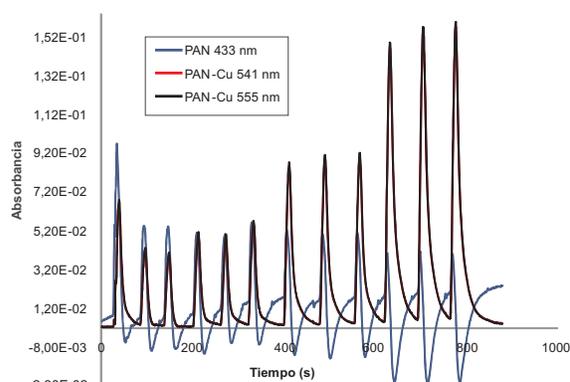


Figura 4. Comparación de los Diagramas del complejo Cu-PAN a longitudes de onda de 541 y 555 nm.

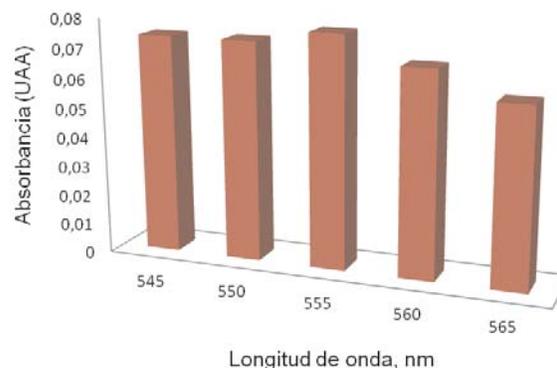


Figura 5. Longitud de onda de máxima absorción.

materiales de referencia certificado. Por su parte, Thakur y col. (11), desarrollaron un método manual por esta técnica pero a 520 nm, empleando el reactivo PAN solubilizado en un medio surfactante triton X-100 y utilizando una mezcla de cloroformo/N,N'-difenilbenzamidina (DPBA) como solvente extractante. Una vez optimizada la longitud de onda, se procedió a evaluar el efecto del pH y la concentración del agente formador del complejo.

Efecto del pH. Se estudió el efecto del pH sobre la absorbancia del complejo Cu-PAN, estas pruebas se llevaron a cabo probando varias soluciones amortiguadoras desde pH ácido como acetato de sodio/ácido acético, carbonato de sodio/bicarbonato de sodio hasta básico como la solución de cloruro de amonio/hidróxido de amonio. Las soluciones amortiguadoras de pH ácido (5 y 6) generaron burbujas en el sistema, precipitado en la celda y disminución de la señal analítica. Por el contrario, cuando se empleó el cloruro de amonio/hidróxido de amonio en un rango de 9,0 a 9,5 (ca. 0,1 M), se observó una señal intensa y estable, siendo el pH de 9,5 y 0,1 M la concentración de la solución amortiguadora como parámetros óptimos.

Efecto de la concentración del agente formador del complejo. Se estudió el efecto de la concentración del PAN, para lo cual se varió desde $2,0 \times 10^{-4}$ hasta $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, encontrándose que la concentración de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ fue la que generó la señal más intensa, lo que favoreció el menor consumo de reactivos y permitió tener un método amigable con el ambiente. A diferencia de lo reportado por Thakur y col. (11) y Romero y col. (26), quienes emplearon una concentración de PAN de 10^{-3} mol L⁻¹.

Medio para la preparación del agente formador del complejo. El agente formador del complejo (PAN) presenta una baja solubilidad en soluciones acuosas (11) y se favorece a medida que disminuye el pH, es decir en medio ácido. Sin embargo, es inverso al

medio favorable para la formación del complejo (pH básico; 9,00-9,50) por esta razón se empleo el mínimo volumen de ácido que permitiera la solubilización del reactivo y lo mantuviera en solución durante la dinámica del sistema en el que se combina con la solución amortiguadora. Se estudiaron tres concentraciones: 0,50; 0,75 y 1,00 mol L⁻¹ y se observó que la intensidad de la señal se incrementó a medida que disminuyó la concentración del ácido ya que la formación del complejo se favoreció a mayores valores de pH y pequeños volúmenes de H₂SO₄; es así que la mayor señal 0,0686 de absorbancia se obtuvo a 0,50 mol L⁻¹ de ácido, pero en este punto la solución de la reacción se tornó turbia debido a la baja solubilidad del PAN. Por esta razón, se seleccionó 1 mol L⁻¹ como la concentración óptima debido a que se mantiene la solubilidad del PAN y el pH de 9,5. Esta selección también se realizó considerando las limitaciones de la Ley de Beer, donde expresa que las soluciones deben ser diluidas y transparentes (12).

Efecto de iones interferentes. Debido a que el método no es específico para el ión Cu²⁺, se evaluó el efecto de otros iones que pueden estar presentes en la matriz de la muestra. Los iones Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺ y Zn²⁺ son los que más frecuentemente se reportaron como interferentes (20), por lo que se estudiaron a diferentes rangos de concentración fisiológicas (ca. 1-20 mg L⁻¹). Se estableció la variación máxima de la señal de absorbancia en $\pm 8\%$, empleando una solución estándar de 2 mg L⁻¹ de Cu(II). La cantidad de iones interferentes tolerados se estableció como aquella que produce un cambio en la absorbancia menor a 8%; los resultados se muestran en la tabla 1. Los iones Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺ y Zn²⁺ resultaron ser tolerables ya que generaron cambios en la señal menor o igual a 8%, mientras que para los iones Ca²⁺ su presencia fue tolerable hasta 0,5 mg L⁻¹ ya que por encima de este valor las variaciones de la señal son mayores al 8%. Sin embargo, estas concentraciones son mayores a las que pueden encontrarse

Tabla 1
Efecto de iones externos en la determinación de Cu^{2+} (patrón de 2 mg L^{-1})

| Iones | Concentración Añadida (mg L^{-1}) | Porcentaje de variación en la señal analítica |
|------------------|--|---|
| Fe^{2+} | 1,0 | 3,5 |
| | 2,0 | 5,0 |
| Fe^{3+} | 1,0 | 3,0 |
| | 2,0 | 5,0 |
| Mg^{2+} | 2,0 | 5,0 |
| | 2,5 | 5,0 |
| Ca^{2+} | 0,5 | 7,5 |
| | 10,0 | 10,5 |
| | 20,0 | 13,0 |
| Zn^{2+} | 1,5 | 5,5 |
| | 2,0 | 6,0 |

normalmente en el suero sanguíneo, donde el rango normal es de $0,85\text{-}1,05 \text{ mg L}^{-1}$ para Ca. Estos resultados son similares a los hallados por Thakur y col. (11) y Morales y col. (12), donde los iones evaluados no interfirieron en la determinación de Cu (II) por el método complejométrico.

Parámetros de diseño del sistema FIA

Ya que el sistema FIA empleado es muy sencillo, se tomaron como parámetros a optimizar la longitud del reactor, el cual determina el tiempo de mezclado para formar el complejo y el volumen de muestra.

Longitud del reactor. Para este estudio se empleó el método univariante. Para lo cual se varió la longitud del reactor inicial (2 m). Para ello se construyeron dos reactores de 1 y 5 m, empleando conectores y tuberías de Teflón® de diámetro interno de 0,51 mm. Se evaluó la longitud del reactor en FIA para disminuir o controlar la zona de dispersión; esto además, permitió aumentar el tiempo de reacción y la intensidad de las señales (27). De tal manera, que se analizaron en línea soluciones patrones de Cu a diferentes concentraciones (ca. $0,2\text{-}6,0 \text{ mg L}^{-1}$) variando dichas longitudes, encontrando

que al utilizar una longitud de 5 m, disminuyó la señal analítica y el análisis de muestra por hora. Mientras que con los reactores de 1 y 2 m la señal analítica se mantuvo constante. En tal sentido, se seleccionó el reactor de 2 m por mostrar buena sensibilidad ($A = 0,0293c + 0,0026$; $r: 0,9974$) y un rango dinámico lineal de $0,2$ a 6 mg L^{-1} .

Volumen de muestra. Se varió el volumen de muestra con respecto al volumen inicial (ca. $183 \mu\text{L}$). Para este estudio, se trabajó con seis volúmenes de muestra (ca. de $16,5$ a $400 \mu\text{L}$) e inyectando soluciones estándares de Cu en el rango de concentraciones de $0,2$ a $12,0 \text{ mg L}^{-1}$, variando dichos volúmenes. En la figura 6, se observa que al aumentar el volumen de inyección la señal analítica se incrementó. Sin embargo, dado que el método se aplicará a muestras clínicas se decidió trabajar con un volumen intermedio de $183 \mu\text{L}$, ya que se obtiene una sensibilidad adecuada ($m = 0,0323$) y un rango lineal desde $0,2$ hasta $12,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Parámetros analíticos

Rango lineal. Se logró una linealidad desde $0,2$ a $12,0 \text{ mg L}^{-1}$; sin embargo, se decidió construir una curva de calibración

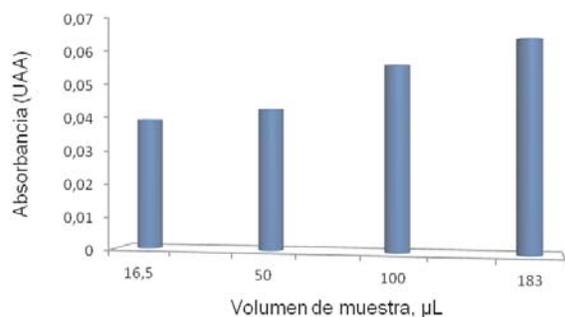


Figura 6. Optimización del volumen de muestra.

hasta $6,0 \text{ mg L}^{-1}$, debido a que la concentración de cobre en este tipo de muestras está por debajo de ese rango de concentración.

La cuantificación de la concentración del metal en las muestras se realizó a través de la ecuación de la recta ($A = 0,0322 [\text{Cu}] + 0,0006$, $r = 0,9992$). La figura 7 muestra el fiagrama y la curva de calibración de las soluciones estándar para la determinación de Cu^{2+} por el método propuesto.

Límite de detección (L_D) y de cuantificación (L_C). El límite de detección (L_D , definido $3\sigma_b$) y el límite de cuantificación (L_C , definido $10\sigma_b$) calculados fueron $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Precisión. La precisión del método propuesto se evaluó mediante la determinación de cobre en la muestra de suero sanguíneo diluido. En la tabla 2 se muestra en detalle el estudio de precisión como repetibilidad y reproducibilidad, empleando para su evaluación los estadísticos: media (\bar{X}), desviación estándar (DE, mg Cu L^{-1}) y desvia-

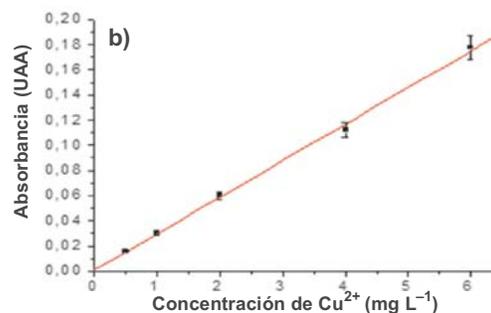
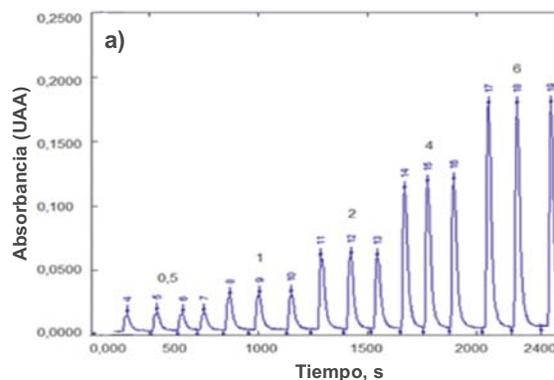


Figura 7. a) Fiagrama. b) Curva de calibración para la determinación de Cu^{2+} por el método propuesto. Reactor: 2 m; Volumen de muestra: $183 \mu\text{L}$; PAN $2 \times 10^{-4} \text{ M}$; Solución amortiguadora de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (pH 9,5); Longitud de onda; 555 nm.

ción estándar relativa o coeficiente de variación (DER o CV, %) (23). Los experimentos se realizaron a tres alícuotas de la muestra de suero sanguíneo, preparadas por triplicados e inyectadas por pentaplicado. Obteniéndose una precisión promedio de 3,87%,

Tabla 2

Estudio de Repetibilidad y reproducibilidad para la determinación de Cu^{2+} en suero sanguíneo humano por FIA-UV-vis

| Muestra | Media (mg L^{-1}) | Repetibilidad | | Reproducibilidad | |
|---------|---------------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------|---------|
| | | DE* (mg L^{-1}) | DER** (%) | DE (mg L^{-1}) | DER (%) |
| 1 | 0,57 | 0,028 | 4,91 | 0,030 | 5,26 |
| 2 | 1,16 | 0,010 | 0,93 | 0,051 | 4,39 |

*Desviación Estándar. ** Desviación Estándar Relativa.

para el metal bajo estudio, lo cual se ubica dentro del valor aceptado en las normas internacionales (ca. $\leq 5,0\%$) e indica la excelente reproducibilidad del método desarrollado.

Exactitud. En la tabla 3 se muestra el estudio de exactitud, el cual se evaluó mediante estudios de recuperación en muestras de suero, obteniendo un porcentaje promedio de recuperación de $99,1 \pm 2,3\%$. Este resultado corrobora la adecuada exactitud para el método analítico desarrollado; ya que este valor está dentro del intervalo teórico aceptable a nivel internacional de 95 a 105% (7, 23).

Interferencias de matriz. Este estudio se realizó empleando el método de la adición estándar. En la figura 8 se observan las curvas de calibración y de adición estándar obtenidas para la determinación de cobre en suero sanguíneo humano por el método propuesto. Las ecuaciones obtenidas para las curvas de adición estándar y de calibración son: $A = 0,0441c + 0,0095$ ($r = 0,9903$) y $A = 0,0442c - 0,0005$ ($r = 0,9996$), respectivamente. El error relativo promedio entre las pendientes de la curva de calibración y la de adición estándar fue 0,22%. Este resultado indica que no existieron efectos de matriz significativamente importantes, lo que permitió cuantificar la concentración del metal a través de las curvas de calibración.

Bajo estas condiciones optimizadas, el sistema FIA permitió procesar 38 muestras

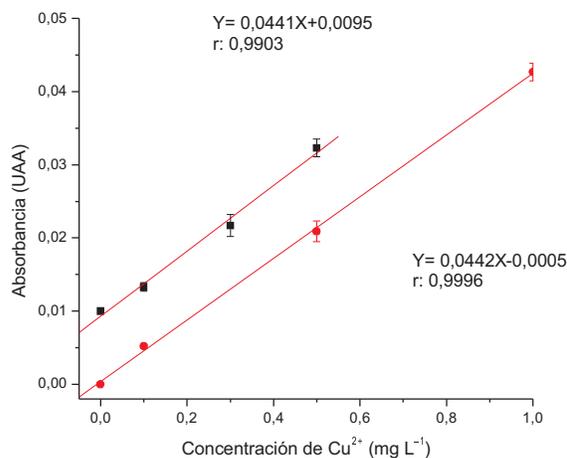


Figura 8. Estudio de interferencia de matriz para determinar Cu^{2+} en suero sanguíneo humano; donde, ■ adición estándar y ● curva de calibración.

por hora, lo cual es una ventaja para la determinación de este metal en fluidos biológicos como el suero sanguíneo, debido a que se convierte en una herramienta de gran utilidad para el análisis de rutina en centros de salud y facilita el diagnóstico y tratamiento inmediato a pacientes con insuficiencia o incremento del metal en cuestión.

Validación del método propuesto

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos con el método propuesto y con la técnica tradicional FAAS. Se evaluaron los resultados obtenidos por las dos técnicas instrumentales, a través de la prueba

Tabla 3
Estudio de recuperación en muestras de suero sanguíneo humano para la determinación de Cu^{2+} por FIA-UV-vis

| Muestra | Concentración mg L^{-1} | | | Recuperación (%) |
|---------------------------|----------------------------------|----------|------------|------------------|
| | Agregado | Esperado | Encontrado | |
| Suero sanguíneo | 0 | 0,30 | 0,29 | 96,66 |
| | 1 | 1,3 | 1,28 | 98,46 |
| | 2 | 2,3 | 2,35 | 102,17 |
| $\bar{X} \pm \text{DE} =$ | | | | 99,1 \pm 2,3 |

Tabla 4
Determinación de Cu²⁺ (mg L⁻¹) en suero sanguíneo humano por FAAS y el método propuesto

| | Método Propuesto FIA/UV-Vis | Método de Referencia FAAS |
|---|--------------------------------|------------------------------|
| A | 1,60 ± 0,005 | 1,50 ± 0,008 |
| B | 1,44 ± 0,004 | 1,74 ± 0,011 |
| C | 1,69 ± 0,06 | 1,26 ± 0,015 |
| D | 1,27 ± 0,01 | 1,50 ± 0,016 |

FAAS: espectrometría de absorción atómica con llama.

FIA/UV-VIS: análisis por inyección en flujo/ ultravioleta visible.

estadística *t-student* (23). No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de cobre por los dos métodos empleados para un $p > 0,05$ y, en consecuencia, la determinación analítica de cobre en el tipo de muestra clínica estudiada puede llevarse a cabo por cualquiera de los dos métodos.

Conclusión

El método propuesto basado en la formación de un complejo organometálico (complejometría) y FIA-UV-Vis demostró ser lineal, reproducible y exacto; con adecuados límites de detección y cuantificación al compararlos con el método FAAS, al mismo tiempo es una técnica simple, rápida, de bajo costo, que puede ser utilizada en análisis de rutina en laboratorios clínicos, permitiendo analizar 38 muestras/hora. Una de las principales ventajas del método desarrollado es que no requiere de tratamientos de muestras ni de procesos de extracción para su determinación.

Agradecimientos

Al Vicerrectorado Académico y Administrativo de la Universidad del Zulia. Proyecto No. 2009000672 LUZ-FONACIT (Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Referencias bibliográficas

1. BARANY E., BERGDAHL I., BRATTEBY L., LUNDH T., SAMUELSON G., SCHÜTZ A., SKERFVING S., OSKARSSON A. *Toxicol Lett* 134: 177-184. 2002.
2. KAPLAN L.A. *Química Clínica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid (España). p.p 1370. 1991
3. LOPES CMPV., ALMEIDA A., SANTOS J.L.M., LIMA J.L.F.C. *Anal Chim Acta* 555: 370-376. 2006.
4. ALEBIC-JURETIC A., FRKOVIC A. *J Trace Elem Med Biol* 19: 191-194. 2005.
5. ABBASI S., KHANI H., TABARAKI R. *Food Chem* 123: 507-512. 2010.
6. MORO M.A., GROTTO D., BULCÃO R., POMBLUM V.J., BOHRER D., DE CARVALHO L.M., OLIVEIRA S., GARCIA S.C. *J Bras Patol Med Lab* 43(4): 251-256. 2007.
7. FERNÁNDEZ D., VÁSQUEZ A., HERNÁNDEZ M., OCANDO A.M., MANZANILLA J.G., SOTO M., ÁLVAREZ F., GRANADILLO V.A. *Atomic Spectrosc* 26(3): 117-123. 2005.
8. LIM H.B., HAN M.S., LEE K.J. *Anal Chim Acta* 320:185-189. 1996.
9. XIANG G., ZHANG Y., JIANG X., LIJUN H., FAN L., ZHAO W. *J Hazard Mater* 179: 521-525. 2010.

10. ADINARAYANA REDDY S., JANARDHAN REDDY K, NARAYANA LAKSHMI S., VARAD REDDY A. **Food Chem** 109: 654-659. 2008.
11. THAKUR M., KANTI DEB M. **Talanta** 49: 561-569. 1999.
12. SKOOG D., WEST D., HOLLER J., CROUCH S. **Fundamentos de Química Analítica**. Editorial Thomson. D.F, México. 458-465. 2005.
13. MORALES L., TORAL M.I., ÁLVAREZ J.M. **Talanta** 74: 110-118. 2007.
14. CASSELLA R.J. **Microchem J** 72: 17-26. 2002.
15. GOUDARZI N. **J Brazil Chem Soc** 18(7):1348-1352. 2007.
16. TORAL M.I., RICHTER P., RODRIGUEZ C. **Talanta** 45: 147-153. 1997.
17. McGIFFORD R.W., SEEN A.J., HADDAD P.R. **Anal Chim Acta** 662: 44-50. 2010.
18. ZAMZOW H., COALE K.H., JOHNSON K., SAKAMOTO C.M. **Anal Chim Acta** 377: 133-144. 1998.
19. JIMENEZ-DIAZ M., SCHOSINSKY-NAVERMANN K. Validación de la determinación de cobre en suero empleando el ácido bicinónico: relación cobre/ceruloplasmina en pacientes con enfermedad de Wilson y pacientes sin la enfermedad. **Rev costarric cienc méd.** [online]. 23(1-2): 33-43, 2002. [citado 10 Septiembre 2010], Disponible en la World Wide Web.: <http://www.scielo.sa.cr/scielo>
20. DO NASCIMENTO ROCHA S.A., FALCÃO DANTAS A., VALLI JAEGER H., SPINOLA COSTA A.C, DOS SANTOS LEÃO E., GONCALVES M.R. **Spectrochim Acta Part A** 71: 1414-1418. 2008.
21. TESHIMA N., GOTOH S., KAZUNORI I, TADAO S. **Anal Chim Acta** 557: 387-392. 2006.
22. Standard Specification for Water. American Society for Testing and Materials. USA, Philadelphia, 1997.
23. MILLER J.N., MILLER J.C. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**. Editorial Prentice Hall. Madrid (España). 45-59. 2004.
24. DAY R.A., UNDERWOOD A.L. **Química Analítica Cuantitativa**. 5a Edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Naucalpan de Juárez. 241. 1989.
25. AGNIHOTRI N.K., SINGH V.K., SINGH H.B. **Talanta**. 45: 331-341. 1997.
26. ROMERO C.H., PELLERANO R.G., VASQUEZ F.A. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. p. 1-4. Resumen E-017. Argentina. 2005.
27. JAIMES M.D. Para obtener el título de Licenciatura en Química. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Zulia, Venezuela, 64 pp. 2005.
28. PINO PEREZ F., PEREZ BENDITO D. **Análisis de elementos trazas por espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible**. Publicaciones de la Universidad de Sevilla y Monte de Piedad y Caja de Ahorro de Córdoba (España). 89. 1983.