

Técnicas colorimétricas

Colorimetric techniques

Fecha de presentación: 7 marzo 2017

Fecha de aceptación: 31 agosto 2017

Erick Giovanni Aparicio canela

Colegio Libre de Estudios Universitarios, Campus Oaxaca

18

“La colorimetría es la ciencia que estudia la medida de los colores”

Resumen

Las técnicas colorimétricas se basan en la medida de la absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas. En principio todos los sistemas que cuantifican el color a partir de tres variables poseen aspectos colorimétricos: Luminancia, Longitud y Pureza.

En el ámbito forense son de gran ayuda por la eficacia y exactitud para disminuir los errores cometidos en el laboratorio y dar mayor certeza a las pruebas emitidas en el ámbito de serología forense que se dan a través de los dictámenes.

Palabras Clave

Técnicas colorimétricas, colorimetría y fotolorimetría, técnica de Bencidina o Adler, Técnica de la fenoltaleína o de Kastle-Mayer, Técnica de leuco malaquita verde, Técnicas espectroscópicas.

Abstract

The colorimetric techniques are based on the measurement of radiation absorption in the visible area by colored substances. In principle all the systems that quantify the color from three variables have colorimetric aspects: Luminance, Length and Purity.

In the forensic field, they are very helpful due to the effectiveness and accuracy to reduce the mistakes made in the laboratory and to give greater certainty to the tests issued in the field of forensic serology that are given through the opinions.

Keywords

Colorimetric techniques, colorimetry and photolorimetry, Bencidin or Adler technique, Phenolphthalein or Kastle-Mayer technique, Leuco malachite green technique, Spectroscopic techniques.

INTRODUCCIÓN

La colorimetría es una de las técnicas empleadas con mayor asiduidad en los laboratorios de Bioquímica. Esta técnica suministra información cualitativa y cuantitativa sobre sustancias en disolución. El colorímetro es un instrumento diseñado para dirigir un haz de luz paralela monocromática a través de una muestra líquida y medir la intensidad del haz luminoso emergente.

De acuerdo a (Florkin, 1962) señala que los antecedentes sobre esta teoría son los datos que se muestran a continuación:

“Los primeros colorimétricos se calibraban a ojo comparando el color de una solución con los de una serie de discos coloreados. Los resultados obtenidos eran muy subjetivos y no muy exactos. Los colorimétricos visuales solo tienen ahora un interés histórico y no se describen en libros. La célula fotoeléctrica tiene la ventaja sobre el ojo humano de poder determinar el grado de absorción de un color y de ser mucho más objetiva.”

Estas técnicas se basan en la medida de la absorción de radiación de la zona visible por sustancias coloreadas. En algunas ocasiones la muestra que deseamos determinar no posee color por sí misma; en tal caso, es preciso llevar a cabo un desarrollo de color empleado reactivos que den lugar a sustancias coloreadas con la muestra que interesa estudiar. La colorimetría y fotolorimetría no son en realidad distintas y la diferencia estriba en el tipo de instrumental empleado, de forma que se denomina colorímetro a aquellos aparatos en los que la longitud con la que vamos a trabajar se selecciona por medio de filtros ópticos en los fotolorimétricos o espectrofotómetros la longitud de onda se selecciona mediante dispositivos mono-cromadores.

Las técnicas colorimétricas se basan en la medida de la absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas. En algunas ocasiones, la muestra que deseamos determinar no posee color por sí misma en tal caso es preciso llevar a cabo un desarrollo de color empleando reactivos que den lugar a sustancias coloreadas con la muestra que interesa estudiar.

En principio todos los sistemas que cuantifican el color a partir de tres variables poseen aspectos colorimétricos.

Un color queda definido por tres parámetros:

- Luminancia: medición luminosa de la intensidad de la radiación: subjetivamente se habla de luminosidad

y se dice que un color tiene mucho brillo (claro) o poco brillo (oscuro). Se le puede simbolizar con L y su unidad de medida es (Cd/m^2).

- Longitud de onda predominante es: la longitud de la radiación monocromática correspondiente. Subjetivamente se habla de matriz o tono y se dice que un color es amarillo, verde, azul, etc. Se le puede simbolizar con $2d$ y su unidad es (nm) o (mm) o también el Angstrom.
- Pureza: magnitud de la dilución de un color en blanco. Se representa por un índice variable entre 0 y 1. Subjetivamente se habla de saturación. Y se dice por ejemplo que un color rosa (mezcla de rojo con blanco) está poco saturado en contraposición de un rojo que sí lo está. Se lo puede simbolizar con P .

La fracción de luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda está relacionada con el paso óptico y con la concentración de la especie absorbente. Estas dos relaciones están combinadas en la ley de Lambert-Beer:

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$$

“El círculo cromático”

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración —a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas—; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución —a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará—; y por último, depende de ϵ , una constante de proporcionalidad —denominada coeficiente de extinción— que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de ϵ dependen de las de c y l . La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M , con lo que las dimensiones de ϵ resultan ser $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar (ϵM). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M , por ejemplo $g \cdot L^{-1}$, las dimensiones de ϵ resultan ser distintas, por ejemplo $g^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$, y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico (ϵ_s).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos, ϵ varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

La aplicación obvia de la ley es el uso del colorimétrico para determinar la concentración de una gran variedad de moléculas que absorben luz (p.ej. carotenos, clorofila, hemoglobina, etc). La técnica se extiende a sustancias no coloreadas como azúcares o aminoácidos después de alguna reacción capaz de convertir sustancias incoloras en derivados coloreados. Justamente mediante el empleo de las técnicas para la realización de los materiales su-

perfiles que son el objeto de los distintos análisis y cuyo ejemplo radical es el análisis de la respuesta espectral.

TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS

COLOR

¿Qué es el color?

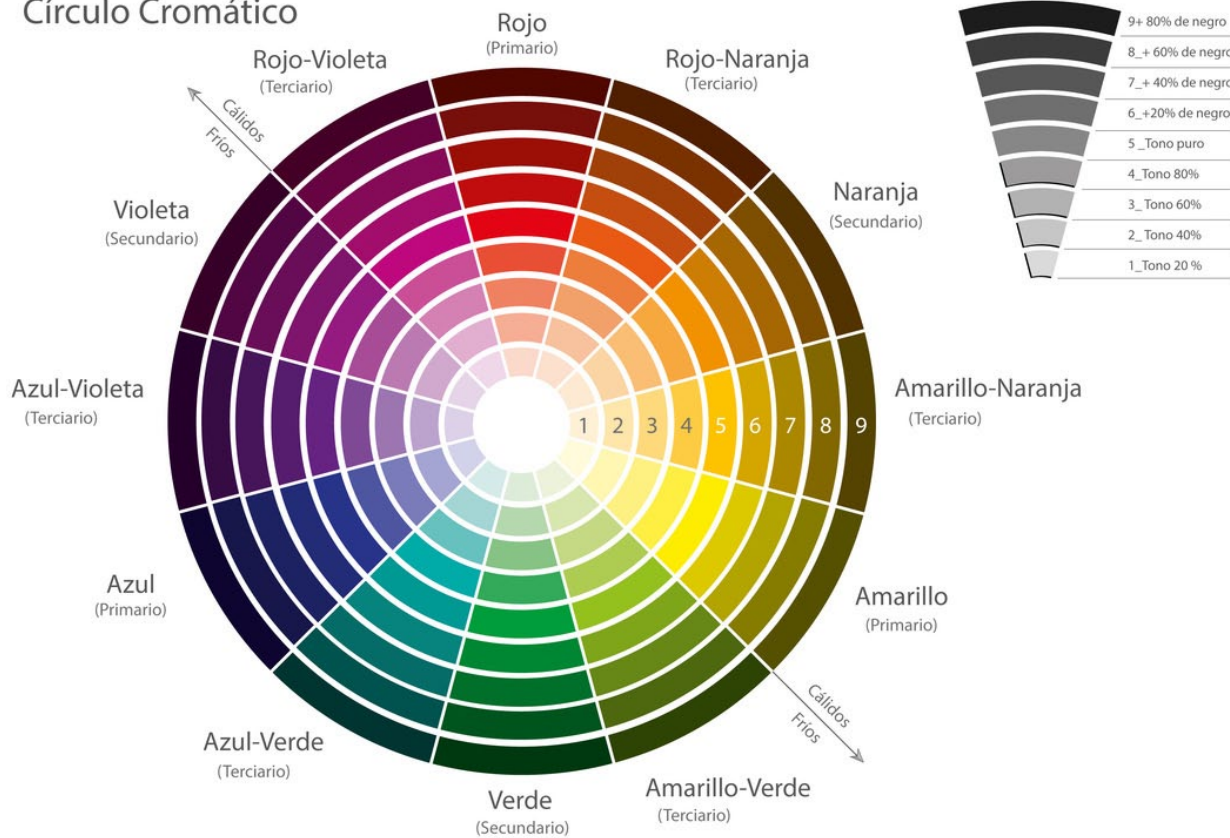
El color es un atributo que percibimos de los objetos cuando hay luz. La luz es constituida por ondas

Propiedades del color

Las definimos como el tono, saturación, brillo.

- Tono, matiz o croma es el atributo que diferencia el color y por la cual designamos los colores: verde, violeta, anaranjado.
- Saturación: es la intensidad cromática o pureza de un color Valor (value) es la claridad u oscuridad de un color, está determinado por la cantidad de luz que un color tiene. Valor y luminosidad expresan lo mismo.
- Brillo: es la cantidad de luz emitida por una fuente lumínica o reflejada por una superficie. / Luminosidad, es la cantidad de luz reflejada por una superficie en comparación con la reflejada por una superficie blanca en iguales condiciones de iluminación.

Círculo Cromático



20

electromagnéticas que se propagan a unos 300.000 kilómetros por segundo. Esto significa que nuestros ojos reaccionan a la incidencia de la energía y no a la materia en sí. Las ondas forman, según su longitud de onda, distintos tipos de luz, como infrarroja, visible, ultravioleta o blanca. Las ondas visibles son aquellas cuya longitud de onda está comprendida entre los 380 y 770 nanómetros.

Los objetos devuelven la luz que no absorben hacia su entorno. Nuestro campo visual interpreta estas radiaciones electromagnéticas que el entorno emite o refleja, como la palabra "color".

ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Muchos compuestos tienen espectros característicos de absorción en la región visible y ultravioleta y esto hace posible la identificación de dichos materiales en una mezcla.

Proteínas: los aminoácidos triptófano y tirosina absorben a 280 nm lo cual constituye el fundamento de una técnica muy sensible para determinar proteínas sin que se destruya la muestra. Las proteínas también absorben en el ultravioleta lejano, debido a los enlaces peptídicos.

Ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos y las bases que los

componen presentan una absorción máxima en la región de 260 nm. La magnitud de absorción de estos ácidos constituye una medida de su integridad ya que los ácidos nucleicos parcialmente degradados absorben más fuertemente que los materiales nativos. Las bases que componen los ácidos poseen un espectro de absorción suficientemente diferente lo cual permite usarlo en su identificación.

Hemoglobina: cuando se modifican las hemoglobinas por medio de ciertas drogas o de monóxido de carbono, se presenta un cambio característico en la absorción máxima y por lo tanto la presencia de estos agentes modificantes puede ser detectada y medida.

TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS APLICADAS EN EL ÁMBITO FORENSE

Técnica de Bencidina o Adler

Fundamento químico

Las peroxidasas sanguíneas son catalasas que, como su nombre lo indica, poseen actividad catalítica en las reacciones de oxidación, ya que tienen la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos, produciendo la liberación de radicales oxhidrilo según la siguiente reacción:

El grupo hem de la hemoglobina posee esa actividad enzimática, que puede catalizar la ruptura del peróxido de hidrógeno. Mientras no estén presentes otras sustancias orgánicas oxidantes, esa actividad de la hemoglobina, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, que al reaccionar con la bencidina la oxidará formando un compuesto intensamente azul.

Esta técnica tiene una sensibilidad de 1,300,000 a 500,000. Un resultado negativo excluye la presencia de sangre; si la reacción es positiva requiere, como toda técnica de orientación, del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden obtener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a las peroxidasas o bien con otros materiales oxidantes como las manzanas, espárragos, frijol, zarzamora, entre otros.

Preparación del reactivo

- Solución de bencidina 0.25 g. de bencidina se disuelven en 175 ml de etanol y se añaden 5 a 10 gotas de ácido acético glacial. Se guarda en un frasco gotero ámbar, en refrigeración.
- H₂O₂ al 3%; también en un frasco gotero ámbar.

Procedimiento:

- Humedecer un hisopo con agua destilada y frotarlo sobre la mancha problema.
- Añadir al hisopo 1 ó 2 gotas de solución bencidina, después de unos momentos de observar que no de coloración con ésta.
- Poner la misma cantidad de sobre el hisopo.
- En caso positivo aparecerá rápidamente una coloración azul.

Técnica de la fenoltaleína o de Kastle-Mayer

Fundamento químico

Esencialmente la rige el mismo principio que se mencionó en la reacción de Adler. La diferencia estriba:

- La fenoltaleína debe ser reducida previamente a fenoltaleína incolora y este reactivo, por su labilidad, debe ser guardado en refrigeración en frasco ámbar.
- Se trabaja en medio alcalino en vez de un medio ácido.
- Se efectuará un calentamiento previo a 100 °C durante un minuto.

Se apuntará a continuación el comportamiento de las peroxidasas vegetales, que explicará el porqué de las modificaciones apuntadas:

- Termolabilidad: Se ha confirmado que las peroxidasas vegetales se inactivan por calentamiento a 100 °C. A la misma temperatura las peroxidasas de origen animal son estables. Un periodo de un minuto a 100 °C servirá para diferenciar una de otra.
- Tiempo: Las peroxidasas de origen animal son muy estables, las manchas de sangre humana dan resultados positivos aún después de varios meses de haberse producido. Cuando manchas de la misma edad pero de origen vegetal son tratadas de esta manera, dan resultado negativo.
- pH: las peroxidasas de las plantas reaccionan en medio ácido, pero no en medio alcalino. Por esta razón, ésta técnica. A pesar de esto debe efectuarse pruebas testigo sin añadir agua oxigenada a muestras previamente calentadas.

Esta técnica es mucho más sensible que la de la bencidina, siendo esta sensibilidad de 1: 1,000,000 a 10,000,000.

Preparación del reactivo

- Solución de fenoltaleína:
 - Fenoltaleína 2g
 - Hidróxido de potasio 20 g
 - Agua destilada 100 ml.
 - Polvo de zinc 20g

Disolver estas sustancias y colocarlas a reflujo con el polvo de zinc hasta completa decoloración. Esta solución madre deberá guardarse en un frasco ámbar en refrigeración y deberá añadirse polvo de zinc.

- Solución de trabajo: Diluir la solución madre en etanol en la proporción de 1:5; la que también deberá refrigerarse en tanto no se use.
- Solución de agua oxigenada al 3%

Procedimiento

- Humedecer un hisopo con solución salina, frotar la muestra problema y pasarlo a un tubo de ensaye con 2 ml de la misma solución.
- Calentar un minuto a 100 °C
- Añadir unas gotas del reactivo, esperar unos segundos y
- Agregar agua oxigenada.
- En caso positivo se obtendrá una coloración rosa brillante.

Técnica de leuco malaquita verde

Fundamento químico

Se basa, al igual que las anteriores en una reacción de oxidación y reducción. La estructura química de esta sustancia recuerda a la de la fenolftaleína. El prefijo leuco se refiere a la forma reducida incolora; la forma leuco puede ser preparada por reducción de la malaquita verde.

Como en el caso de la fenolftaleína, la forma leuco puede ser oxidada por la acción de las peroxidasas para dar la forma oxidada verde. Esta técnica fue reportada por Hunt, quien señala la encontró más confiable para sangre, aunque menos sensible que la bencidina.

Preparación del reactivo

- Se prepara una mezcla sólida que contenga: 0.32 g de perborato de sodio y 0.10 gr. De malaquita verde; se mezclan perfectamente y se guardan en frasco ámbar. Esta mezcla dura un año sin perder su estabilidad.
- El solvente se prepara diluyendo 6.6 ml de ácido acético glacial en 3.3 ml de agua destilada.
- Preparar el reactivo de trabajo, inmediatamente antes de usarlo, disolviendo la mezcla sólida a) en la solución b); si en el reactivo recién preparado llegara a observarse la más leve coloración verde, no deberá usarse.

Procedimiento

- La mancha sospechosa, se levanta con un hisopo humedecido en agua destilada
- Se le agregan unas gotas del reactivo recientemente preparado.
- En caso positivo se observará una coloración verde.

Técnicas espectroscópicas

Estas técnicas permiten poner de manifiesto, mediante espectros de absorción, la presencia de hemoglobina y/o de alguno de sus derivados, en manchas de sangre.

En el aspecto forense Silveyra nos habla sobre la

hemoglobina y de cómo nos ayuda y la manera en la que puede ser tratada en el aspecto de técnicas espectroscópicas como lo dice a continuación:

“La hemoglobina, diluida en agua (oxihemoglobina) tiene dos bandas de absorción en la zona del espectro visible cuyos máximos se encuentran a 575 y 540 nm respectivamente; así como la banda de Soret, típica de los derivados porfirínicos, próxima a la región del ultravioleta, que para la hemoglobina se encuentra a 412 nm siendo esta banda mucho más ancha que las dos primeras.”

En la investigación serológica, no es suficiente con obtener el espectro de la oxihemoglobina, sino que es necesario someter la muestra en una marcha espectral.

De acuerdo a (Gisbert Calabuig, 2004) señalan lo siguiente sobre el proceso que debe llevar:

- Se extrae la mancha de sangre con agua destilada
- Se filtra
- Se lleva al espectrofotómetro ultravioleta visible de doble haz, que permita realizar un barrido espectral con registro gráfico; la hemoglobina así estudiada registra bandas de absorción a 575, 540 y 412 nm
- Posteriormente, y a ese mismo tubo, se añaden unas gotas de reductor como el sulfhidrato de amonio recientemente preparado, formándose así el hemocromógeno, con el que se registrarán bandas de absorción con máximos a 559 y 530 nm.

En la práctica forense cotidiana en el laboratorio de la PGJDF se ha comprobado que una mancha es de sangre con una metodología mucho más simple y rápida:

- Impregnar un pequeño trozo de 5x5 mm de tela limpia, sin apresto, de color blanco con la muestra problema.
- Colocar la muestra así obtenida en un tubo de ensaye y añadirle 5 ml de agua destilada, dejándola reposar durante 10 minutos para lograr una eficiente extracción; pasado este tiempo filtrar.
- Efectuar el barrido espectral en la zona de espectro visible; se obtendrán tres bandas de absorción; dos finas a 575 y 540 nm y una banda ancha a 412. Este espectro corresponde a la oxihemoglobina.
- Efectuar nuevamente la extracción de la muestra como se indica en el punto 2, pero utilizando en vez de agua destilada, 5 ml de una solución de ferricianuro de potasio al 0.5 %. Al realizar el barrido espectral en la región del visible, se obtendrá una banda a 630 nm banda que corresponderá a la metahemoglobina.
- Sobre la misma celda de muestra, añadir unos gránulos de cianuro de potasio; al efectuar el registro espectroscópico, deberá desaparecer la banda de la longitud de onda correspondiente a 630 nm y se obtendrá una banda a 540 nm debida a la formación de cianometahemoglobina.

“Cromatografía y la ley de Lambert y Beer”

CONCLUSIÓN

Los métodos fotométricos son técnicas analíticas basadas en la medición de la radiación electromagnética absorbida, reflejada o emitida por una sustancia dispersantes en una solución. Para efectos cuantitativos, todas ellas se basan en la aplicación de la ley de LamberBeer, ley que establece básicamente una proporción lineal entre la magnitud de la absorción y la concentración de las sustancias absorbente. A través de estos métodos fotométricos, es posible medir con gran precisión muchas sustancias coloreadas por fotometría visual o colorimetría. La colorimetría consiste en la comparación visual del color de las soluciones de las sustancias problema con una serie de patrones, hasta conseguir la coincidencia. Esta técnica entonces nos permite la identificación demuestras a través de la comparación de sustancias patrón, y una vez que se consigue la igualación visualmente intensidad de los colores de las soluciones, se miden las longitudes de solución, aplicando

la ley de Beer se calcula la concentración y la identificación de nuestra sustancia.

En el ámbito forense son de gran ayuda por la eficacia y exactitud para disminuir los errores cometidos en el laboratorio y dar mayor certeza a las pruebas emitidas en el ámbito de serología forense que se dan a través de los dictámenes.

BIBLIOGRAFÍA

- Florkin. y Stotz E. Comprehensive Biochemistry. Vol.3 Methods for the Study of Molecules, Amsterdam. Elsevier.1962
- SILVEYRA, Jorge O. "Sistemas de Identificación Humana" 1ª edición. Ed. La Rocca, Buenos Aires 2006.
- Gisbert Calabuig. Medicina legal y toxicología .6ª edición Barcelona 2004.
- <http://www.bioquimica.dogsleep.net/Laboratorio/Plummer/Chp04.pdf>
- <https://es.scribd.com/doc/54879734/Colorimetria>
- <http://criminalistica.mx/descargas/documentos/pdf/TecnicasHematologiaForense.pdf>

