



Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales



Universidad Politécnica de Madrid



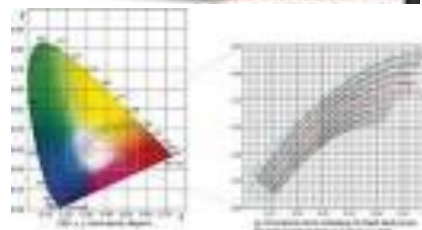
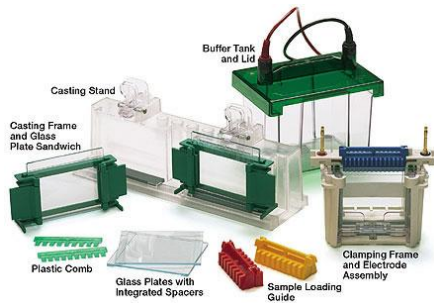
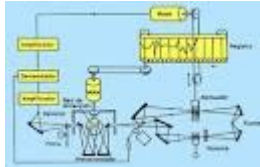
***Prácticas con técnicas instrumentales de análisis
físico-químico en laboratorios industriales***

Por: *José Vicente Alonso Felipe*
Ingeniero Técnico Industrial (UVa) & Master Universitario MIMARMA (UPM)

E.T.S. Ingenieros Industriales (Laboratorio QUÍMICA I)
Universidad Politécnica de Madrid

DETERMINACIONES CON TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO.

CONTROL DE CALIDAD EN LABORATORIOS DE LA INDUSTRIA y EN LABORATORIOS DE ANÁLISIS Y ENSAYOS QUÍMICOS y FÍSICO-QUÍMICOS.



Relación de técnicas habituales que se desarrollan en este texto:

- 1.- Técnicas de análisis por espectroscopia molecular (Vis-UV, FTIR). Análisis de aniones, cationes, extracción y caracterización de un aceite vegetal, cafeína y proteínas.
- 2.- La turbidimetría como técnica de medida. Nefelometría.
- 3.- Técnicas de cromatografía y electroforéticas. Aplicaciones en bioquímica.
- 3.- La refractometría y la polarimetría. Aplicaciones para contrastar pureza de sustancias, caracterización y medida de contenido en azúcares.
- 4.- Medidas instrumentales con colorímetros y espectro-colorímetros. Caracterización del color en vinos y otros productos. Síntesis de colorantes. Métrica del color.
- 5.- Caracterización de productos: parámetros físico-químicas de interés, métodos de medida y manejo de normas UNE – EN ISO, ASTM. Como ejemplo: medidas con viscosímetros capilares, contenido en cloro activo en lejías, evaluación de la dureza del agua, caracterización de aceite de oliva en UV, valoración de tensoactivos, etc.

Conocimientos previos deseados:

Operaciones básicas en un laboratorio químico: manejo de materiales y preparación de reactivos, normas fundamentales de seguridad, montajes de vidrio, normalización con patrones, uso del areómetro y del picnómetro (densidad o peso específico), medida del pH y conductividad, medida del punto de fusión, operaciones de evaporación y secado, técnicas de filtración, precipitación, extracción, destilación y rectificación, uso del rotavapor, centrifugación, conocimientos básicos de técnicas cromatográficas, valoraciones o titulaciones, cristalización y purificación, etc.

Familiarización con:

Procedimientos normalizados de trabajo *PNT's*, normas UNE-EN ISO, ASTM, farmacopeas, disposiciones oficiales BOE, OCDE, etc.

Buenas prácticas de laboratorio *GLP's*. Calibración, trazabilidad e incertidumbre de las medidas. Intervalo de tolerancia. Manejo de sustancias peligrosas.

El proceso instrumental de medida en laboratorios de análisis químico es aplicable a:

QUÍMICO en general. AGRARIO: ENOLÓGICO, LACTEO, SUELOS, etc. ALIMENTACIÓN, MEDIO AMBIENTE, POLÍMEROS Y FIBRAS TEXTILES, BIOLÓGICO, CLÍNICO, INDUSTRIAL-MINERO, PETROQUÍMICO, BARNICES, PINTURAS Y RECUBRIMIENTOS, etc.

Bibliografía y páginas web:

- 1.- <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index1.html>. Operaciones básicas en el laboratorio de química. Universidad de Barcelona.
- 2.- http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/petit/TEMA%201.pdf. Introducción al análisis instrumental. UAM.
- 3.- Guach Torres, J. *Reflexiones sobre el análisis enológico: el proceso de la medida química. El laboratorio enológico*. Rev. Enólogos nº 40 (marzo-abril 2006), 41 (mayo-junio 2006) y 43 (septiembre-octubre 2006).
- 4.- <http://www.yolanda-rios.net/materiales/UVTeoria.pdf>. Teoría espectroscopía UV - visible. Transiciones electrónicas en moléculas orgánicas. Resumen muy completo y didáctico.
- 5.- https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/lhh345a/EspectroscopiaMolecular.pdf. Espectroscopía molecular. Absorción ultravioleta. Define y enumera de forma concisa: cromóforos, auxocromos, bandas de transferencia de carga y bandas de campo ligando.
- 6.- http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_15437.pdf. Interpretación de bandas de compuestos en el infrarrojo en forma resumida y tabulada.
- 7.- <http://www.uhu.es/tamara.garcia/quiml/apuntes/TEMA%203.pdf>. Descripción muy completa de fundamentos, equipamiento, elucidación de bandas, espectroscopía derivada, aplicaciones de la espectroscopía UV-vis.
- 8.-Guarnizo-Franco-Martinez-Yepes. Título: **Experimentos de Química Orgánica** con enfoque en ciencias de la vida, (2009). Editorial: ELIZCOM S.A.
- 9.- instrumentos de análisis para enología de **HANNA INSTRUMENTS**: valoración automática, alcohol, conductividad, ácido tartárico, azúcares, hierro, cobre, etc. <http://www.hannainst.es/catalogo-por-aplicaciones/alimentacion/enologia>
- 10.- <http://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5980-1397ES.pdf>. Fundamentos de Espectroscopía UV – visible moderna. Conceptos básicos (2000). Agilent Technologies.
- 11.- <https://utanuror7.files.wordpress.com/2012/07/uv-vis-parte-11.pdf>. Instrumentación en espectrometría óptica.

PARTE GENERAL. INTRODUCCIÓN.

Etapas del proceso analítico total:

- 1.- Planteamiento general del problema técnico-científico y/o socio-económico.
- 2.- Planteamiento específico del problema analítico y definición del objetivo.
- 3.- Elección del método: norma o procedimiento normalizado de trabajo, métodos de la OCDE, farmacopeas, bibliografía diversa.
- 4.- Toma de muestra o muestreo. Estadística: técnicas de muestreo aleatorio.
- 5.- Tratamiento y preparación de la muestra.
- 6.- Realización de la medida por la técnica instrumental seleccionada.
- 7.- Tratamiento y evaluación de los datos. Cálculo de valores medios, desviaciones, incertidumbres, errores, etc.
- 8.- Interpretación de los resultados. Conclusiones, cuando proceda.
- 9.- Realización del informe.

El proceso de medida química se inicia siempre con una **concreción clara** de cuál es el **problema** o determinación y que **información buscamos**. Esta etapa es fundamental ya que condiciona la selección del método a utilizar y la fiabilidad de la información obtenida. Al definir el problema debemos tomar en consideración el **analito** y la **matriz** del objeto problema. En función del método elegido y de cómo sea la matriz se pueden producir **interferencias** en el proceso de medida y por tanto, resultados sesgados o erróneos.

Al definir el problema debemos decidir con que **exactitud, precisión e incertidumbre** queremos determinar el **analito** en cuestión.

Parece un contrasentido, pero la exactitud tenemos que decidirla *a priori*, lo cual no quiere decir que podamos obtenerla. Lo que es evidente es que para obtener resultados muy exactos tendremos que utilizar técnicas de gran sensibilidad y aplicar procedimientos analíticos muy rigurosos, mientras que para obtener resultados menos exactos, o tan solo aproximados, el rigor puede ser bastante menor.

Por ejemplo, la medida rigurosa del pH requiere el empleo de un pH-metro de garantía que habrá que calibrar previamente con patrones trazables y certificados de acuerdo a un método o PNT, mientras que una medida aproximada se puede obtener con papel de pH. Ambas medidas son buenas, pero evidentemente la exactitud e incertidumbre son diferentes.

Una vez definido el problema se procede a la selección de la técnica instrumental analítica de medida y del método de análisis.

Como ya se sabe existen muchas técnicas analíticas que se concretan en una gran variedad de instrumentos. Para resolver un problema concreto pueden ser útiles diferentes técnicas. Por ejemplo el contenido de hierro en un vino puede determinarse por ICP, espectroscopía de absorción atómica o mediante espectroscopía visible. Las dos primeras son técnicas muy sensibles que requieren el empleo de costosos equipos, personal más cualificado, procedimientos rigurosos y mantenimiento caro, mientras que la espectroscopía visible-UV requiere equipos de coste bajo-medio, fácil manipulación y metodología simple. La elección de una u otra técnica dependerá de la exactitud e incertidumbre con que queramos determinar nuestro **analito**, que a su vez dependerá de la trascendencia del resultado, del tiempo disponible y del presupuesto. Una vez seleccionada la técnica se procede a concretar el método de análisis y para ello, en ocasiones suele ser necesario proceder a la *investigación bibliográfica*.

En muchos casos, los problemas a resolver son usuales y la información se encuentra en métodos oficiales de análisis, normas, farmacopeas, etc., pero en el caso de determinaciones especiales o fuera de lo habitual habrá que proceder a consultas bibliográficas y búsquedas en bases de datos.

La toma de muestras es una etapa fundamental en cualquier procedimiento de análisis. La toma de muestras requiere un *plan de muestreo* diseñado de forma estadística, donde se ha de precisar con rigor el número y tamaño, así como la forma (lugar, tiempo, etc.) y las precauciones a tomar para la conservación de las muestras. La naturaleza de la muestra y la heterogeneidad de la misma condicionan de forma decisiva el plan de muestreo. Existen multitud de procedimientos y técnicas estadísticas para diseñar un plan de muestreo.

La preparación de la muestra junto con la toma de muestra como se ha dicho, son etapas críticas en el proceso de medida química. Normalmente las muestras, ya en el laboratorio, no pueden analizarse directamente, sino que hay que prepararlas para adecuarlas la técnica y al método a aplicar.

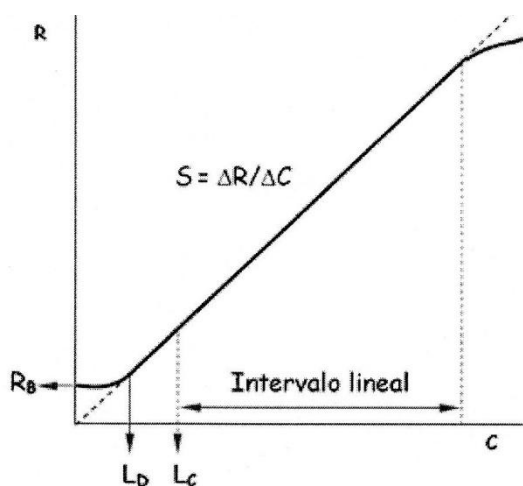
Mayoritariamente, las técnicas analíticas requieren muestras líquidas y homogéneas.

CALIBRACIÓN.

Las técnicas analíticas miden normalmente una propiedad química y/o física del *analito* de interés, propiedad que puede relacionarse con su concentración o en general con cualquier otro parámetro a determinar. Así, en las técnicas volumétricas o titulaciones o técnicas **titrimétricas** medimos el volumen de solución *valorante* que reacciona con el *analito*, en las técnicas electroquímicas medimos diferencias de potencial en las medidas del pH o medidas de conductividad del medio en las conductivimetrías.

En los métodos espectrofotométricos se mide la absorción o la emisión de radiación con un dispositivo detector que nos proporciona una respuesta en forma de señal eléctrica. Para transformar esta medida instrumental en información química se procede a lo que se denomina **calibración** que es el proceso mediante el que se establece **la relación entre la propiedad medida y la concentración del *analito***.

Todas las técnicas analíticas requieren un proceso de calibración que se efectúa mediante la utilización de un compuesto químico patrón o estándar. De esta forma en las volumetrías la calibración se efectúa determinando la concentración de la solución valorante empleada para valorar un patrón químico. En este caso, la relación se establece por cálculo matemático ya que los parámetros que intervienen, como la estequiometría de la reacción volumétrica y el peso molecular del *analito*, son valores constantes. En todo caso, en la mayoría de los métodos instrumentales la relación entre la propiedad medida y la concentración del *analito* se debe hallar experimentalmente, ya que dicha relación se encuentra muy influenciada por las condiciones de trabajo. La calibración se efectúa preparando una serie de soluciones patrón del *analito* de las que se mide la propiedad correspondiente en unas condiciones experimentales concretas. Al representar gráficamente estos datos se obtiene por lo general una **recta de calibrado** o más generalmente **curva de calibrado** como la representada en la figura:



En algunas ocasiones la relación entre la propiedad medida y la concentración NO es lineal y se obtiene una **curva de calibrado**, pero normalmente se puede transformar matemáticamente en una relación lineal. En general no se suele realizar con más de 6 puntos o medidas y repitiendo mediciones para las concentraciones más bajas y para las más altas del analito en cuestión.

De la recta de calibrado se pueden obtener diferentes informaciones de gran interés analítico.

En primer lugar **la sensibilidad** de la técnica, expresada por la pendiente de la recta $S = \Delta R / \Delta C$, que por definición es la capacidad de la técnica para diferenciar entre concentraciones parecidas o también la capacidad para determinar pequeñas concentraciones del analito. Evidentemente, cuanto **mayor sea la pendiente, mayor será la sensibilidad**, ya que una misma concentración nos proporcionará mayor respuesta instrumental. Además, se puede observar que al disminuir la concentración, disminuye la respuesta, llegándose a un valor mínimo de concentración por debajo del cual la respuesta es siempre la misma. Esta concentración es el **límite de detección** (LD), ya que el instrumento proporciona una respuesta que ya no depende de la concentración. A partir de este dato se puede determinar el **límite de cuantificación** (LC), que es la concentración mínima que se puede determinar con garantía en cuanto a su exactitud. A partir de este valor se establece el intervalo lineal donde se puede trabajar cuantitativamente con la técnica correspondiente.

La metodología de calibración antes comentada se conoce como el **método del patrón externo** y es el más utilizado. No siempre es posible obtener rectas de calibrado con este método. A veces la matriz de la muestra puede influir en la respuesta instrumental (efecto matriz) y en este caso se debe utilizar el **método de las adiciones estándar**, con patrones preparados con la misma cantidad de muestra a las que se adicionan concentraciones conocidas del *analito* de interés. En otros casos, la respuesta instrumental es poco reproducible por estar influida por unas condiciones experimentales no controlables totalmente. Para solucionar este problema se puede utilizar el **método del patrón interno**, en el que se utiliza un segundo compuesto patrón o más que mediante su relación se minimiza la variabilidad de la respuesta, muy utilizado en cromatografía líquida y de gases.

Finalmente se debe tener presente que una recta de calibrado y las medidas de las muestras deben efectuarse en las mismas condiciones experimentales y que de forma general, no puede utilizarse una recta de calibrado obtenida en otro momento o con otros reactivos o de distinta calidad o con otro equipo ya que esto aumentaría el error de medida.

MEDIDA QUÍMICA.

Tras establecer la recta de calibrado se procede a la medida de la variable. La respuesta instrumental obtenida se interpola en la recta de calibrado para hallar la concentración en la alícuota de que se trate, luego habría que referirlo al peso o volumen de sustancia muestreada. Esto será posible siempre que dicha concentración se halle dentro del intervalo lineal definido en la calibración. Si se halla entre los límites de detección y de cuantificación podremos detectarla, pero NO cuantificarla con la exactitud requerida. Si se halla por debajo del límite de detección significa que no podemos detectarla, aunque en ningún caso podremos asegurar que la concentración sea nula, sino que el método utilizado no es suficientemente sensible para determinar la concentración del *analito* en la muestra. En caso contrario, si la concentración se halla por encima del intervalo establecido **nunca podremos extrapolar** fuera de este intervalo, sino que deberemos diluir la muestra o tomar una muestra menor o emplear pasos de celda más finos o incluso cambiar de método analítico.

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS.

El resultado obtenido no es únicamente un *valor*, normalmente en forma numérica, sino que lleva asociado una *incertidumbre*. Esto resulta evidente por el hecho de que al efectuar tres réplicas de una misma muestra obtenemos tres resultados más o menos parecidos, pero nunca idénticos. Por ello el resultado se expresa con un valor numérico obtenido normalmente a partir de la media de los resultados (x_m) y la incertidumbre que se calcula a partir de la desviación estándar de los resultados (s) y de funciones de distribución estadísticas (*t Student p.e.*) en función del número de replicados (N). Así se obtiene el *intervalo o los límites de confianza*.

Resultado = Valor medio \pm incertidumbre

$$\mu = x_m \pm t \cdot s / \sqrt{N}$$

Este intervalo de confianza nos indica con una probabilidad establecida por la distribución estadística *t* (normalmente un 95%) que el resultado verdadero (μ) se halla dentro de él. Lamentablemente, nunca podremos determinar el valor verdadero sino una buena aproximación con más o menos incertidumbre lo cual es suficiente en la mayor parte de las situaciones. Debemos tener en cuenta tiempo, costes de material referencia, réplicas, rigurosidad de la medida, etc. para trabajar con más o menos incertidumbre. Frecuentemente al comparar resultados se utilizan los valores sin tener en cuenta la incertidumbre asociada, pudiendo, con ello, cometerse graves errores. Si dos valores diferentes tienen intervalos de confianza que se solapan, hay cierta posibilidad de que no se trate de dos valores diferentes y pueda considerarse como el mismo valor. Todo esto se valora con el tratamiento estadístico de resultados.

Normalmente para no encarecer análisis y evitar gasto innecesario de tiempo se suelen realizar tres determinaciones en la muestra.

Al aplicar un método analítico siempre surge la duda de si los resultados obtenidos pueden estar sesgados por un error del método que no controlamos, malas rutinas, materiales de referencia no idóneos, deficiente mantenimiento o calibración de equipos, etc. Para ello existen ensayos *interlaboratorios* que nos permiten determinar estos posibles errores y ver como estamos trabajando.

Para un determinado *analito* pueden existir diferentes métodos de referencia junto con una gran cantidad de métodos de rutina y de cribado.

PROPIEDADES DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Las **propiedades más importantes** de los métodos de análisis son:

- **Exactitud:** puede definirse como el grado de concordancia o de cercanía entre el resultado obtenido y el valor aceptado como verdadero. Las diferencias observadas son el error o sesgo. Esta propiedad está relacionada con **la trazabilidad** de un resultado.
- **Precisión:** puede definirse como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de forma repetitiva en una misma muestra. Si las repeticiones se efectúan en las mismas condiciones (mismo laboratorio, mismo equipo, mismo personal, etc.) se la conoce como **repetibilidad** y si las condiciones son diferentes (distintos laboratorios) como **reproducibilidad**. Es una medida de la dispersión de los valores y se expresa en forma de desviación estándar o de varianza. Esta propiedad está relacionada con **la incertidumbre** del resultado.
- **Sensibilidad:** puede definirse como la capacidad para discriminar entre resultados muy parecidos o también, como la capacidad para determinar valores muy pequeños. Se obtiene a partir de la relación entre la respuesta analítica y la concentración (**calibración**). De esta propiedad se derivan los **límites de detección y de cuantificación** del método. El primero es la concentración mínima de *analito* que puede diferenciarse estadísticamente de un ensayo en blanco, mientras que la segunda es la concentración mínima que puede ser determinada con una incertidumbre prefijada.
- **Selectividad:** se define como la capacidad de un método para obtener resultados que dependan exclusivamente de la concentración del *analito*. La selectividad de un método viene condicionada por la presencia de **interferencias**. La máxima selectividad, sin interferencia alguna, da lugar a **métodos específicos**.
- **Robustez:** se define como la capacidad de un método para aportar resultados poco influidos por pequeñas variaciones de las condiciones experimentales. Está relacionado con la **fiabilidad** que es la capacidad de un método para mantener la exactitud y la precisión a lo largo del tiempo.

Validación de los métodos de análisis.

Se entiende por validación de un método de análisis la caracterización del mismo a partir de la determinación de sus propiedades analíticas principales: exactitud (trazabilidad), precisión (incertidumbre), selectividad, intervalo de aplicación, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, robustez, etc. El proceso de validación de un método consiste en establecer y verificar las prestaciones del método para obtener la información requerida y la veracidad de esa información.

En este proceso podemos destacar tres apartados principales, cada uno de ellos con unos objetivos y unas herramientas adecuadas para la validación.

Metodología para la validación de un método de análisis.

CONCEPTOS	OBJETIVOS	Herramientas de VALIDACION
Campos de aplicación	Definir las matrices analizables. Definir el intervalo de valores analizables.	Límites de detección y cuantificación. Estudio de la robustez.
Error sistemático	Establecer el intervalo de respuesta lineal. Verificar la especificidad del método. Verificar la veracidad del método.	Estudio de la linealidad. Estudio de la especificidad. Comparación con: <ul style="list-style-type: none"> • Un método de referencia • Materiales de referencia • Ensayos interlaboratorios.
Error aleatorio	Establecer la precisión del método.	Estudio de la repetibilidad. Estudio de la reproducibilidad intralaboratorio.

En el apartado del **campo de aplicación del método** se definen las matrices analizables con el método, su naturaleza, estado, etc. así como el intervalo de valores analizable con el método. También se deben establecer los límites de detección y cuantificación, aunque no es necesario en el caso de *analitos* o parámetros cuyo valor inferior no tienda a cero (*p.e.* grado alcohólico, pH, riqueza sacárica, etc.). Así mismo se establece la robustez del método, por ejemplo como influyen perturbaciones ambientales como cambios temperatura, % HR, etc.

Evaluación del error sistemático. Los errores sistemáticos, también llamados errores determinados, son los que resultan de alteraciones operacionales concretas del procedimiento analítico. Por ejemplo, un instrumento mal calibrado, una pesada incorrecta, un enrase mal efectuado, un reactivo deteriorado, una filtración incompleta, no respetar un determinado tiempo de disolución o reacción, etc. Es decir una operación mal efectuada, y por tanto estos errores son evitables. La cuestión es operar siguiendo las **Buenas Prácticas de Laboratorio** (BPL ó GLP). Estos errores que pueden ser positivos o negativos, son importantes ya que inciden directamente en el resultado y afectan a la exactitud del mismo.

El objetivo inicial es concretar la linealidad del método, es decir establecer el intervalo de concentraciones en el que hay una relación lineal entre la respuesta y la concentración. Se obtiene una recta de calibrado con una serie de patrones con concentraciones superiores al límite de cuantificación y se verifica su linealidad. Si es lineal su pendiente será la sensibilidad del método. La especificidad del método se establece comprobando la influencia de diversos compuestos interferentes, que puedan estar habitualmente en la matriz objeto de análisis.

Finalmente se verifica la exactitud del método, para ello se dispondrá de valores de referencia. Estos se obtienen fundamentalmente a partir de **materiales de referencia o de métodos de referencia**. Los primeros son materiales o sustancias que tienen perfectamente establecidos los valores de algunos de sus parámetros de concentración y que se emplean principalmente para la evaluación de métodos de análisis. Existen materiales de referencia certificados (MRC) en los que las concentraciones se han establecido por organismos competentes de reconocido prestigio (NIST, BCR, BAM, etc.). Comparando luego resultados. En el caso de existir un método de referencia se aplican el método en estudio y el de referencia a una misma muestra (o serie de muestras) y se comparan los resultados.

Los **Ensayos o ejercicios interlaboratorios** son aquellos en los que diferentes laboratorios se organizan para realizar de forma independiente una serie de análisis de unas mismas muestras. El objetivo de este ejercicio es múltiple: a) validación del método utilizado (ejercicios colaborativos), b) certificación de los valores e incertidumbres de los materiales de referencia y c) evaluación de la calidad de los resultados obtenidos por un laboratorio (pruebas de aptitud o pericia). Es una excelente metodología para evaluar la exactitud de un método en estudio o el nivel de calidad con que opera un laboratorio.

Evaluación del error aleatorio. En esta etapa se evalúa la precisión del método a partir del estudio de la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio.

De forma resumida la validación de un método consiste en comprobar:

Especificidad: verificación de la capacidad del método de estimar de forma unívoca los *analitos* en presencia de los demás componentes.

Linealidad: verificación de la capacidad del método de obtener resultados, dentro de un rango predefinido, que sean directamente proporcionales a la concentración del *analito* en la muestra.

Exactitud (*accuracy*): estimación de la proximidad entre los resultados obtenidos con el método aplicado y el valor verdadero.

Precisión: expresión del grado de comparabilidad entre resultados individuales cuando el método se lleva a cabo en las mismas condiciones experimentales.

Repetibilidad: verificación de las variaciones que se pueden generar en el interior de un mismo laboratorio por un operador diferente y por una nueva sesión analítica efectuada en un día diferente.

Reproducibilidad: verificación de las variaciones de resultados generadas por varios laboratorios distintos empleando un mismo método en condiciones diversas.

Robustez: medida de la capacidad del método de producir resultados estadísticamente invariables después de pequeñas variaciones deliberadas aplicadas al método.

MATERIAL DE REFERENCIA (PATRÓN TERCIARIO):

Material o sustancia, en el cual una o más de sus propiedades están suficientemente bien establecidas para que sea usado en la calibración de un aparato, la estimación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (PATRÓN SECUNDARIO):

Material en el que los valores de una o más de sus propiedades están certificados por un procedimiento técnicamente validado, bien sea que este acompañado de, o pueda obtenerse, un certificado u otra documentación emitida por un ente certificador.

MATERIAL ESTANDAR DE REFERENCIA (PATRÓN PRIMARIO):

Material emitido por la Oficina Nacional de Normas de Estados Unidos (*U.S National Bureau of Standards*) cuyo nombre fue cambiado recientemente a Instituto Nacional para Normas y Tecnología (*National Institute for Standards and Technology, NIST*) u organismo similar Europeo o nacional de algún país.

Definiciones con las que conviene familiarizarse:

Patrón: medida materializada, instrumento de medida, material de referencia o sistema de medida destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores de una magnitud para que sirvan de referencia.

Patrón primario: patrón que es designado o ampliamente reconocido como poseedor de las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor se acepta sin referirse a otros patrones de la misma magnitud.

Patrón secundario: patrón cuyo valor se establece por comparación con un patrón primario de la misma magnitud. La mayor parte de los materiales de referencia certificados (ver más adelante) se encuentran dentro de esta categoría puesto que la certificación de los valores de la propiedad está usualmente realizada por un procedimiento que es trazable a patrones primarios.

Patrón de referencia: patrón, en general de la más alta calidad metrológica disponible en un lugar o en una organización determinada, del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

Material de referencia (MR): material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales.

Material de referencia certificado (MRC): material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza.

Material de referencia interno: es aquél preparado por un laboratorio para su propio uso.

Trazabilidad: propiedad del resultado de una medición o de un patrón tal que pueda relacionarse con referencias determinadas, generalmente a patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbre determinadas.

Incertidumbre del valor certificado: estimación ligada a un valor certificado de una magnitud (o propiedad) que caracteriza la zona de valor en el interior de la cual se puede encontrar "el valor verdadero" con un nivel de confianza indicado.

1. **Patrón Internacional:** Reconocido por un acuerdo internacional para servir como referencia internacional para la asignación de valores a otros patrones de la magnitud considerada (**BIPM** - Buro internacional de Pesos y Medidas),
2. **Patrón Nacional:** Patrón reconocido por una decisión nacional, en un país, para servir como referencia para la asignación de valores a otros patrones de la magnitud considerada (**CENAM, NIST, NRC, NPL, PTB, NRLM, KRISS, etc**),
3. **Patrón Primario:** Es designado o ampliamente reconocido como poseedor de las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor se acepta sin referirse a otros patrones de la misma magnitud,
4. **Patrón Secundario:** Patrón cuyo valor se establece por comparación con un patrón primario de la misma magnitud,
5. **Patrón de Referencia:** En general de la más alta calidad metrológica, disponible en un lugar dado o en una organización determinada, del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar,
6. **Patrón de Trabajo:** Patrón que se utiliza corrientemente para calibrar o controlar medidas materializadas, instrumentos de medida o materiales de referencia. a) Un patrón de trabajo es habitualmente calibrado con un patrón de referencia. – b). Un patrón de trabajo utilizado corrientemente para asegurar que las medidas están realizadas correctamente se denomina patrón de control
7. **Material de Referencia:** Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales. NOTA: Un material de referencia puede presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. Ejemplos: el agua para la calibración de viscosímetros, el zafiro que permite calibrar la capacidad térmica en calorimetría y las soluciones utilizadas para la calibración en los análisis químicos.
8. **Definición de Patrón:** Medida materializada, instrumento de medida, material de referencia o sistema de medida destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores de una magnitud para que sirvan de referencia.

<http://www.portalcalidad.com/foros/1719-diferencia-entre-patrones-referencia-y-materiales-referencia>

Tipos de materiales de referencia.

Se pueden diferenciar distintos tipos de MR:

Físicos: como pueden ser de masa (pesas), longitud de onda, temperatura y otras propiedades físicas.

Sustancias puras: soluciones y mezclas de alta pureza, utilizadas para la calibración en procedimientos de análisis.

MR matriciales: materiales naturales y/o materiales naturales adicionados usados para la verificación de procedimientos analíticos y en casos específicos para la calibración de instrumentos de medida.

Pueden presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. También tratarse de una pieza para ensayo o análisis o de un artículo manufacturado. En ocasiones necesitan de cierta preparación, como los materiales liofilizados o las disoluciones concentradas.

Los materiales de referencia en el campo de la Higiene Industrial y/o la Toxicología Laboral son utilizados, básicamente, para:

- Calibrar instrumentos o equipos de medición.
- Validar métodos analíticos.
- Comprobar la equivalencia de métodos.
- Verificar el correcto uso del método o detectar errores en su aplicación.
- Contrastar la exactitud de los resultados.
- Asignar valores a un material o sistema.

Ejemplo de puesta en marcha de un laboratorio: *El proceso de medida físico-química en un laboratorio enológico. Equipamiento básico y metodología.*

Técnicas analíticas de interés para un laboratorio enológico básico.

Parámetros enológicos	Técnicas analíticas
Peso de muestra/Densidad	Gravimetría
Azúcares totales y densidad Grado alcohólico	Densimetría
Azúcares totales	Refractometría y/o polarimetría
Azúcares reductores, acidez total y volátil Nitrógeno asimilable, SO ₂	Volumetría
pH	Potenciometría
Glucosa y fructosa Ácidos tartárico, málico, láctico y cítrico Ácido glucónico Compuestos fenólicos totales Antocianos y taninos Polifenoles: quercitinas y resveratrol (*) Color Hierro y cobre Nitrógeno asimilable SO ₂	Espectrometría y otras técnicas instrumentales: p.e. cromatografía.

(*) Los compuestos fenólicos del vino incluyen, entre otros, a los ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, gentísico, ferúlico y vanílico) y flavonoides (catequinas, **quercitina y resveratrol**), los que son sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina. Todos provienen de las uvas moradas, particularmente de su piel, que los producen como una forma de protección contra las relativamente altas temperaturas a que están expuestas.

El equipamiento requerido para un laboratorio enológico suele ser básico y económico, en ocasiones muy genérico pero sirve de pauta para un laboratorio de control de calidad en general.

Balanza analítica y granatario.

La balanza analítica es el instrumento gravimétrico fundamental de cualquier laboratorio químico. Se utiliza fundamentalmente para pesar la muestra y los reactivos necesarios para preparar disoluciones patrón. Debe poseer una capacidad de pesada de 150 ó 200 g y tiene que tener una exactitud mínima de $\pm 0,001$ g, aunque lo ideal es que sea de $\pm 0,0001$ g.

Además se debe disponer de un granatario con capacidad de en torno a 1000 g y exactitud de $\pm 0,1$ g. El laboratorio deberá disponer de un plan de verificación y calibración de las balanzas, así como de juego de pesas de referencia y mesa especial anti-vibratoria para balanzas. También es aconsejable un acondicionamiento climático en temperatura y humedad.

Estufa de desecación y recipiente desecador.

Como normalmente todas las operaciones de pesada se hacen con productos secos o deshidratados será necesario disponer de estufa de desecación y recipiente desecador anejo para dejar enfriar y conservar muestras, compuestos, etc. La estufa de desecación con rango hasta 250°C o 300°C deberá estar sujeta a una revisión periódica y calibración con termómetro patrón del laboratorio o sonda termométrica al efecto.

Baños termostatzados y agitadores magnéticos con calefacción.

Ciertas operaciones o procesos de disolución en que sea necesario un control de temperatura nos obligarán a disponer de baño termostatzado con control de temperatura. Estará sometido a un proceso periódico de calibración.

También para facilitar la preparación de disoluciones se dispondrá de agitadores magnéticos con calefacción.

Rotavapor y equipamiento para trabajar con vacío.

Es muy recomendable disponer de este equipamiento para eliminación y recuperación de disolventes tóxicos y evaporación de sustancias sensibles a la temperatura.

Densímetros, alcoholímetros, mostímetros y ebulómetros.

Son instrumentos normalizados y calibrados a 20°C para medir densidad o peso específico, concentración, °Baumé, ° Brix, % etanol en volumen, etc. de disoluciones. Con el alcoholímetro se mide el grado alcohólico de un vino o licor, a partir de la densidad del destilado, por lo que será necesario disponer de un equipo de destilación normalizado y un procedimiento estándar trabajo. Como la densidad depende de la temperatura será necesario el empleo de termómetros normalizados y calibrados para las correcciones precisas.

Habitualmente en el laboratorio enológico el grado alcohólico se determina a partir de la temperatura de ebullición del vino, mediante un dispositivo denominado **ebulómetro**, el ebulómetro *Dujardin-Salleron* es el aparato más sencillo para testar directamente y con precisión el título alcohométrico de vinos secos, de constitución normal.



Ebullómetro Dujardin-Salleron

Este método no está normalizado, pero se puede alcanzar una exactitud de ± 0.2 a 0 - 5% volumen de alcohol en vinos secos, aunque puede dar más error en vinos dulces.



Ebullómetro completo para determinar el grado alcohólico

Por esta razón, la ebullimetría es muy adecuada y recomendable para el control del grado alcohólico, aunque para un correcto funcionamiento es necesario limpiar regularmente el calderín de ebullición, con una disolución de hidróxido sódico al 2-4% hirviendo y comprobar periódicamente la calibración del termómetro.

Material volumétrico y material fungible general de laboratorio.

El material volumétrico que se utiliza en las medidas analíticas es fundamentalmente pipetas, buretas, probetas y matraces aforados que serán preferentemente de clase A y vidrio de calidad. Este material requiere un mantenimiento periódico, limpieza y secado al aire a temperatura ambiente o con aire comprimido, para evitar por exceso de temperatura descalibrado del material volumétrico. Periódicamente se comprobará en aquellos materiales más precisos su calibración. Se aforan periódicamente por pesada de su contenido en agua destilada en balanza analítica.

Se dispondrá de material fungible de laboratorio en cantidad suficiente y de calidad.

Refractómetros y Polarímetros.

Son dos instrumentos muy habituales de laboratorio, muy genéricos, pero de amplio uso en laboratorios de vinos, licores, control productos alimenticios, aceites, etc.

El refractómetro se utiliza para la determinación de azúcares totales del mosto, aunque también puede usarse para la determinación del grado alcohólico. El refractómetro puede ser óptico o electrónico, de campo o de sobremesa. La medida está influenciada por la temperatura por lo que se toma como valor normalizado 20°C esto es relativamente sencillo en laboratorio, en campo se puede operar a $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

Los azúcares totales de un mosto permiten estimar el posible valor del grado alcohólico del vino que se obtendrá con este mosto. Se dispondrá de patrones para comprobar periódicamente la calibración del refractómetro y polarímetro.

El grado alcohólico probable se obtiene por cálculo a partir del rendimiento de fermentación que puede oscila entre 16 a 18 gramos de azúcar/litro para obtener un 1% en volumen de etanol en el vino. Es, por tanto, un valor estimativo y aproximado, aunque de gran interés enológico.

El polarímetro se emplea para medir riqueza en azúcares de un producto o sustancia líquida, por ejemplo riqueza en sacarosa de la remolacha, medida de vitaminas, aminoácidos, etc. se fundamenta en el poder rotatorio de las sustancias ópticamente activas al ser atravesadas por luz polarizada.

Medidor de pH, conductividad, oxígeno disuelto, dureza del agua.

El potenciómetro es el instrumento que utiliza un electrodo combinado de vidrio para medir el pH, con otro tipo de electrodos u otra configuración puede medir oxígeno disuelto, iones Ca^{++} y Mg^{++} , conductividad de una disolución.

Debe poder medir pH con una exactitud de $\pm 0,01$ unidades de pH. Disponen de un sistema de compensación de temperatura y se calibran automáticamente con disoluciones tampón estandarizadas de pH (4,01 – 7,00 – 10,01 a 25°C). Una vez calibrado puede usarse una solución patrón de **bitartrato de potasio** (pH 3,56 a 25°C). La solución patrón de pH 4,01 suele ser biftalato potásico (10,211g/l), la solución tampón de pH 7,00 está compuesta por K_2HPO_4 (4,354 g/l) y KH_2PO_4 (3,402 g/l).

La calidad en la medida del pH depende fundamentalmente del estado del electrodo, conservación de las soluciones patrón y calibración y verificación periódica del equipo. Las soluciones patrón de calibración es conveniente que se usen en sobres monodosis para utilizar una vez y desechar. Almacenar en frigorífico. En caso de utilizar soluciones patrón en botella, no utilizar más allá de dos o tres meses de haber abierto la botella. Procurar que estas soluciones estén a temperatura ambiente.

El típico electrodo indicador de vidrio consta realmente de dos electrodos, un electrodo indicador de membrana de vidrio y un electrodo de referencia. El potenciómetro mide la diferencia de potencial entre estos electrodos que es proporcional a la concentración de H^+ .

La vida media de un electrodo de vidrio es de alrededor de un año. Si se utiliza con frecuencia mantenerlo siempre sumergido en agua destilada. La conservación de la membrana del electrodo es crítica y por esta razón cuando no se usa debe estar siempre sumergido en una solución salina (habitualmente una solución 3 M de KCl). Si se prevé que no se va a utilizar durante más de un mes conviene guardarlo limpio y seco.

Cuando el electrodo empieza a dar problemas en la calibración, se puede intentar reactivar la membrana sumergiendo en una disolución de HCl 0,1 M durante una noche y a continuación en una disolución tampón de pH 4,00 o en KCl durante otra noche. Una reactivación más drástica y no habitual es sumergir unos segundos en solución de ácido fluorhídrico al 40%.

Espectrofotómetro.

Se trata de un instrumento muy versátil de análisis. Los habitualmente utilizados son el espectrofotómetro visible-ultravioleta y en menor medida el espectrofotómetro de infrarrojo. Son técnicas que se basan en la absorción de radiación por las moléculas. Cada molécula en función de su configuración electrónica puede absorber unas radiaciones específicas, que se caracterizan por su longitud de onda o su frecuencia. Se pueden emplear tanto para análisis cuantitativo como cualitativo.

En el caso de la absorción en el rango de la luz visible (400 – 700 nm), esta absorción es la razón por la cual las disoluciones se vean coloreadas. Así el vino tinto es rojizo, absorbe en el visible con un máximo en 520 nm.

Periódicamente estos equipos se deben verificar y calibrar bien mediante auto-calibraciones ó auto-chequeos disponibles en los mismos o mediante patrones externos o materiales de referencia.

Instrumentos de análisis para enología de **HANNA INSTRUMENTS**: valoración automática, alcohol, conductividad, ácido tartárico, azúcares, hierro, cobre, etc.
<http://www.hannainst.es/catalogo-por-aplicaciones/alimentacion/enologia>

Una verificación menos rigurosa pero eficiente es la que se consigue comprobando dos parámetros fundamentales:

- **Exactitud de la longitud de onda.** Para asegurarse que la longitud de onda seleccionada por el equipo a lo largo de su barrido coincide con la real se puede realizar mediante un material de referencia que es un filtro de vidrio que contiene un óxido de una tierra rara, como es el óxido de holmio o un compuesto de hafnio, que presentan unos máximos de absorción muy definidos en longitudes de onda del ultravioleta y el visible.
- **Exactitud de la absorbancia.** Para asegurarse el valor de la absorbancia se pueden utilizar como referencia soluciones patrón de compuestos que presenten valores de absorción característicos a determinadas longitudes de onda. Para las medidas en el visible se puede utilizar una disolución de sulfato de cobre pentahidratado, mientras que para el ultravioleta se puede utilizar una disolución de dicromato potásico.
- **Linealidad de la respuesta.** Diluyendo las disoluciones anteriores se puede comprobar la linealidad de la respuesta del espectrofotómetro tanto en visible como en ultravioleta.

En todos los casos se debe establecer **un criterio de aceptación** en función de la exactitud con que se desea trabajar o el error máximo que se quiere aceptar. Si los valores obtenidos en la verificación están incluidos en el intervalo definido nos indica que el equipo cumple las especificaciones establecidas, de lo contrario debe calibrarse o repararse.

La mayor parte de los equipos disponen de software para test de funcionamiento y calibración.

Filtro patrón de óxido de holmio.

Longitudes de onda de referencia: 241,5 nm – 279,4 nm – 287,5 nm – 333,7 nm – 360,9 nm – 418,4 nm – 453,2 nm – 536,2 nm.



Juego estándares calibración espectroscopía Hellma

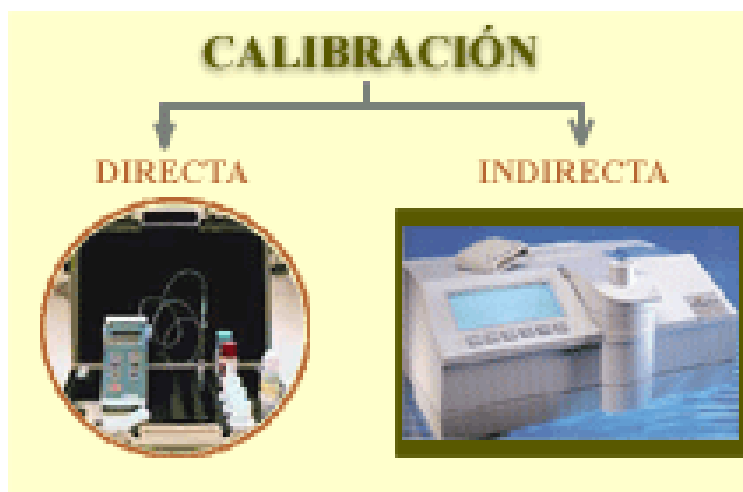
Disoluciones patrón de absorbancia para calibración.

Disolución de $K_2Cr_2O_7$ calidad P.A. o patrón espectroscopia de concentración 0,05 g/l en H_2SO_4 0,005 M para calibración en el ultravioleta:

Longitud de onda λ (nm)	Absorbancia (u.a.) A
235 mínimo	0,626
257 máximo	0,727
313 mínimo	0,244
350 máximo	0,536

Disolución de $CuSO_4 \cdot H_2O$ de calidad P.A. o patrón espectroscopía de concentración 20,0 g/l en H_2SO_4 al 1% para calibración en el visible.

Longitud de onda λ (nm)	Absorbancia (u.a.) A
600	0,068
650	0,224
700	0,527
750	0,817



También la calibración puede ser DIRECTA cuando los valores de patrón y equipo se expresan en las mismas unidades (por ejemplo balanza calibrada con masas patrón) o INDIRECTA cuando los valores del patrón y equipo se expresan en distintas unidades de medida (por ejemplo calibración del espectrofotómetro para determinar nitritos en aguas).

PRIMERA PARTE:

Técnicas de análisis por espectroscopia molecular

(Vis-UV, FTIR)

y

Técnicas cromatográficas y electroforesis.

PRÁCTICA V-UV 01. Análisis colorimétrico de cationes por espectroscopía visible. Análisis de contenido en hierro en tierras, abonos, cementos y vinos.

Introducción y justificación teórica.

El hierro es un mineral indispensable para la vida. Cuando el aporte de este elemento en la dieta es insuficiente comienzan a agotarse las reservas del organismo, originando anemia ferropénica. Esta deficiencia es uno de los problemas nutricionales más frecuentes y se debe en parte a que el hierro contenido en la mayoría de los alimentos (no hemínico) tiene un porcentaje de absorción muy bajo y su disponibilidad se ve afectada por la presencia de otros componentes de la dieta. También es importante para las plantas por eso debe estar presente en cantidad suficiente en suelos y abonos minerales.



Explicación de la absorción en el visible de los elementos de la 1ª y la 2ª serie de los metales de transición. La magnitud de la energía de desdoblamiento de campo ligando Δ depende de varios factores, que incluyen la carga del ion metálico y la posición del elemento en el sistema periódico. Una variable importante atribuible al ligando es la fuerza del campo ligando, que es una medida de la intensidad con que un grupo complejante desdoblará la energía de los electrones d . Es posible ordenar los ligandos más comunes en orden creciente de fuerzas del campo ligando (menor radio-volumen), serie espectroquímica: $I^- < Br^- < Cl^- < F^- < OH^- < C_2O_4^{2-} < H_2O < SCN^- < NH_3 < \text{etilendiamina} < o\text{-fenantrolina} < NO^- < CN^-$. Los metales de transición precisamente por disponer de estos orbitales d pueden formar complejos coloreados con diversos ligandos susceptibles de ser analizados por espectroscopía visible.

En esta práctica analizaremos el contenido de hierro en tierras, abonos, cementos, vino blanco, etc. dado que se trata de un oligoelemento de importancia para las plantas, la alimentación humana, entra en la composición de diversos tipos de cemento como óxidos de hierro, en los vinos para evitar precipitaciones indeseadas, etc.

Fundamento y objetivo.

Son numerosos los compuestos orgánicos que dan complejos coloreados con los iones metálicos, como ejemplo podemos citar: *o*-fenantrolina Fe(II), dimetilglioxima Ni(II) y Pd(II), dietilditiocarbamato Cu(II) y ditizona (difeniltiocarbazona) Pb(II), Hg(II).

Se forma un complejo de hierro (II) con 1,10-fenantrolina [$\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3^{2+}$]. Se añade hidroxilamina (como clorhidrato para aumentar la solubilidad) para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} y mantenerlo en este estado. La reacción es:



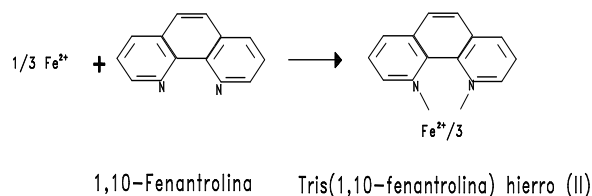
El catión de hierro (II) forma un complejo con el ligando 1,10-fenantrolina color rojo-anaranjado, muy útil en la determinación de hierro en aguas naturales. Este ligando es una base débil que reacciona en medio ácido formando el ión fenantrolinio, FenH^+ .

Este ión reacciona con hierro (II) según la siguiente reacción:



La constante de formación de este complejo es 2.5×10^6 a 25°C. Esta reacción ocurre cuantitativamente a pH entre 3 y 9. Por lo general se utiliza un pH de 3.5 para evitar que precipiten sales de hierro ya que el agua puede contener fosfatos y otros aniones. Para asegurar que el hierro no se oxide a hierro (III), se añade un exceso de agente reductor (hidroxilamina o hidroquinona).

En este caso la fenantrolina se combina como ligando con iones metálicos, gracias a los electrones no compartidos de los dos átomos de nitrógeno:



Tres moléculas de fenantrolina rodean a un ion ferroso formando un complejo muy estable de **color rojo-anaranjado**. Presenta absorciones tanto de campo ligando como de transferencia de carga. Absorbe en longitudes de onda entre 490 y 510 nm (color verde-azulado) típica de metales de transición como Mn, Cr, V, Ti, etc.

Para asegurarnos de que todo el hierro presente en la muestra se encuentra en forma de Fe^{2+} añadimos, antes de la formación del complejo, un agente reductor como es el clorhidrato de hidroxilamina, el cual reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} . La formación del complejo hierro (II) con fenantrolina se da en un intervalo de pH comprendido entre 2 y 9, aunque éste es suficientemente amplio, para asegurar la formación cuantitativa del complejo se adiciona al medio acetato sódico que neutraliza el ácido formado durante la reducción del hierro (III) y ajusta el pH a un valor al que se puede efectuar la formación del complejo. Este método puede aplicarse a vinos blancos o poco coloreados y permite determinar el contenido total de hierro ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$) en el vino.

También se determina hierro en la sal de mesa de acuerdo a la norma:

UNE 34209:1981. Cloruro sódico (sal comestible). Determinación del hierro. Método fotométrico con 1,10-fenantrolina.

Equipamiento y reactivos.

- Espectrofotómetro visible-ultravioleta de doble haz, cubetas de 1 cm de paso óptico de plástico o vidrio óptico, balanza analítica, agitadores magnéticos con calefacción, mortero para reducir muestra, probetas 100 ml, pipetas 1, 2, 5 y 10 ml, vasos de precipitados 100 ml, 250 ml, matraces aforados 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml, embudo de filtración, papel de filtro, papel pH y otro material fungible.
- Disolución de 1,10 – fenantrolina 1 hidrato. Se prepara disolviendo aproximadamente 0,2 g del compuesto en un pequeño volumen de etanol 96% para facilitar la solubilidad y luego se lleva a 100 ml con agua desionizada caliente.
- Disolución de clorhidrato de hidroxilamina. Se disuelven 5 gramos del reactivo en 100 ml de agua desionizada.
- Disolución de acetato de sodio 1 M. Se prepara disolviendo 14,0 gramos de acetato de sodio 3 hidrato en agua desionizada y llevando a 100 ml en matraz aforado.
- Acido clorhídrico concentrado, ácido perclórico, hidróxido amónico en su caso.
- Disolución patrón de 100 ppm de hierro (II). Preparar la disolución de hierro pesando 0,7020 g se sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado desecado $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ calidad PA, disolver en agua desionizada, adicionar aproximadamente 0,1 mol de ácido sulfúrico concentrado y llevar en matraz aforado a 1 litro.

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

Se comienza por construir la curva de calibrado, para lo cual tomaremos 4 vasos de precipitados de 100 ml y se añaden en ellos, exactamente medido con pipeta: 1,00 ml /2,00 ml/3,00ml y 4,00 ml de la disolución patrón de hierro de 100 ppm. Se adicionan aproximadamente y en este orden 20 ml aprox. de agua desionizada, 2 ml de clorhidrato de hidroxilamina, 5 ml de 1-10 fenantrolina y 5 ml de acetato de sodio 1M. Comprobar el pH con papel indicador, en principio cualquier valor de pH comprendido entre 3 y 8 es satisfactorio; si fuese necesario se agrega hidróxido amónico para llevar el pH por encima de 3. Agítese bien y una vez que se ha asegurado que todo se encuentra disuelto y hay ausencia de cualquier tipo de precipitado pasar a matraz aforado de 100 ml, enrasar con agua desionizada, homogeneizar y deja en reposo entre 15 y 30 minutos para el desarrollo pleno del complejo coloreado, si no se van a emplear inmediatamente dejar en lugar oscuro y fresco.

Se podrían preparar hasta 6 disoluciones patrón pero no mejorarían estadísticamente la calidad del ajuste lineal ni los resultados. Se debe procurar que el problema a analizar quede comprendido entre la más diluida y la más concentrada. Para reducir el error fotométrico se debe procurar que la absorbancia de patrones y muestra quede comprendida entre 0,1 UA y 1,5 UA.

A continuación ajustar el cero de absorción con los reactivos pero sin disolución de hierro en todo el visible o solo en la zona de medida según se requiera; medir la absorbancia a 505 nm ó 510 nm en cubetas de poliestireno o vidrio óptico de 1 cm de paso óptico. Realizar varias medidas o réplicas para los patrones más diluido y más concentrado.

Obtener la función de calibrado bien gráficamente o bien por métodos de regresión lineal.

Para analizar muestras problema conviene tener una idea aproximada de la concentración del elemento buscado, para saber qué cantidad de muestra debemos tratar. Si no se tiene idea acerca de la concentración, hay que realizar pruebas preliminares para ajustar la cantidad de muestra a tratar con el rango de absorbancias más adecuado de medición.

Para muestras problema como las que se van a analizar (suelos, abono mineral, cementos) pesar en torno a 0,5 g y tratar en vaso de precipitados con 10 ml de agua desionizada y 3 ml de ácido clorhídrico concentrado o ácido perclórico (**¡precaución si existiera materia orgánica!**) proceder a la digestión ácida calentando 15 minutos a 60°C con agitación. Diluir a 25 ml aprox. con agua desionizada y filtrar recogiendo el filtrado en matraz aforado de 100 ml. Lavar dos veces el residuo que queda en el filtro con pequeñas porciones de agua acidulada con unas gotas de HCl concentrado.

Realizar todas las operaciones de forma cuantitativa para que todo el hierro pase al matraz aforado de la forma más completa, enrasar con agua desionizada hasta 100 ml, esto constituye la disolución de muestra problema.

Suponiendo que la muestra problema contenga en torno al 0,5% de hierro, 10 ml de esta solución contienen 0,25 mg de hierro; volúmenes parecidos darán absorbancias que se encontrarán en los límites de la curva de calibrado.

Por lo tanto, tomar con una pipeta 10 ml de la disolución de muestra problema, verter en un vaso de precipitados de 100 ml y agregar sucesivamente y en este orden tal como se hizo anteriormente 2 ml de clorhidrato de hidroxilamina, 5 ml de disolución de 1-10 fenantrolina y 5 ml de acetato de sodio 1M. Medir el pH y ajustar si fuera necesario. Pasar a un matraz aforado de 100 ml, enrasar y efectuar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a la misma longitud de onda.

Si esta lectura sale fuera de los límites de la curva de calibrado, repetir tomando un volumen diferente del extracto de la muestra sólida o del vino en su caso. Otra solución que se nos podría plantear sería diluir el complejo ya formado de la muestra problema, pero no es una buena práctica de laboratorio ya que nos origina una serie de problemas como: una nueva dilución aumenta error de medida, modifica el pH alterando el equilibrio, como consecuencia de la dilución adición insuficiente del reactivo cromógeno, modifica equilibrio *ferroina/ferriina*, sistematizar los métodos cuando se conoce orden de magnitud del *analito* en la muestra.

Para el análisis de muestras de vino blanco, pipetear 10 ml de vino a un matraz aforado de 100 ml y añadir las mismas cantidades de los reactivos citados y en ese orden. Esperar al menos 10 minutos para que se desarrolle el color completamente y medir la absorbancia a 510 nm.

Informe y resultados.

- 1.-Realizar tres réplicas de la muestra y calcular la incertidumbre. Expresar el resultado en porcentaje de Fe ó en ppm sobre el peso o volumen de muestra en su caso.
- 2.-Explicar por qué se añaden los compuestos clorhidrato de hidroxilamina, acetato de sodio y ácido sulfúrico en la preparación del patrón de hierro de 100 ppm.
- 3.- ¿Qué otros cationes se podrían analizar con 1-10 fenantrolina y cuales pueden interferir?

PRÁCTICA V-UV 02. Análisis colorimétrico de aniones por espectroscopía visible. Análisis de contenido en fosfatos en aguas residuales. Química ambiental.

Introducción y justificación teórica.

Los fosfatos y compuestos de fósforo se encuentran en las aguas naturales en pequeñas concentraciones. Las aguas contaminadas con aguas de desecho, crudas o depuradas, drenajes agrícolas y ciertos vertidos domésticos e industriales contienen normalmente concentraciones apreciables de fosfatos que alteran el ecosistema y causan graves problemas de contaminación, de aquí la importancia de su determinación y control. Los compuestos de fósforo que se encuentran en las aguas residuales o se vierten directamente a las aguas superficiales provienen de fertilizantes eliminados del suelo por el agua o el viento; excreciones humanas y animales; y detergentes y productos de limpieza. La carga de fosfato total se compone de ortofosfato + polifosfato + compuestos de fósforo orgánico, siendo normalmente la proporción de ortofosfato la más elevada. Los compuestos del fósforo (particularmente el orto-fosfato) se consideran importantes nutrientes de las plantas, y conducen al crecimiento de algas en las aguas superficiales, pudiendo llegar a promover la eutrofización de las aguas.



La concentración de fosfatos en un agua natural es fundamental para evaluar el riesgo de eutrofización. Este elemento suele ser el factor limitante en los ecosistemas para el crecimiento de los vegetales, y un gran aumento de su concentración puede provocar la eutrofización de las aguas. Así, Los fosfatos están directamente relacionados con la eutrofización de ríos, pero especialmente de lagos y embalses. En lo referente a las aguas de consumo humano, un contenido elevado modifica las características organolépticas y dificulta la floculación - coagulación en las plantas de tratamiento. Tan sólo 1 gramo de fosfato-fósforo ($\text{PO}_4\text{-P}$) provoca el crecimiento de hasta 100 gramos de algas. Si el crecimiento de algas es excesivo, cuando estas algas mueren, los procesos de descomposición pueden dar como resultado una alta demanda de oxígeno, agotando el oxígeno presente en el agua.

La directiva **EU 91/271/CEE**, en vista del peligro potencial para las aguas superficiales, especifica unos valores límite para el vertido de E.D.A.R. de compuestos de fosfato a las aguas receptoras: 2 mg/l fósforo total (10.000 – 100.000 h-e) o 1 mg/l fósforo total (> 100.000 h-e).

Las concentraciones críticas para una eutrofización incipiente se encuentran entre 0,1-0,2 mg/l PO₄-P en el agua corriente y entre 0,005-0,01 mg/l PO₄-P en aguas tranquilas. La forma asimilable del fósforo es el ión fosfato, aunque en el agua a veces se encuentran compuestos fosforados en estado coloidal o en forma de fósforo elemento.

Los fosfatos existen en forma disuelta, coloidal o sólida. Antes de realizar un análisis, por tanto, es importante considerar qué tipo de fosfatos deberán determinarse. Si solamente se va a determinar ortofosfato (por ejemplo, para el control de la precipitación de fósforo), sólo hay que filtrar la muestra antes de analizarla. Sin embargo, si se va a determinar la concentración de fósforo total (por ejemplo para el control de los valores límite), primero hay que homogeneizar la muestra y después hidrolizarla (someterla a digestión).

Por último, la cantidad de fosfatos se suele indicar como mg/l PO₄-P (mg de P de la molécula de PO₄ por l de agua) o bien en mg/l PO₄ (mg PO₄ por l de agua). La relación entre ambos es: 1 mg/l PO₄-P = 3,06 mg/l PO₄.

Las aguas dulces superficiales son importantes porque son hábitat para la vida animal y vegetal. Uno de los más famosos casos de contaminación del agua como se ha comentado involucra un exceso de entrada de ión fosfato, PO₄³⁻. Las fuentes de fosfato los polifosfatos de los detergentes, las aguas residuales, y la escorrentía de terrenos de cultivo que utilizan fosfatos como fertilizantes. El ión fosfato suele operar como nutriente del crecimiento de algas a mayor entrada de ión ocurre una *hiperfertilización*. La descomposición de una gran masa de algas agota el oxígeno disuelto en el agua, quedando afectada negativamente la vida de los peces. El agua del lago, también se torna fétida, de color verde y viscosa.

El uso de polifosfatos en detergentes ha sido muy habitual. La reacción entre detergentes sintéticos y los iones Ca²⁺ y Mg²⁺ para formar iones complejos disminuye su potencial de lavado. Los iones polifosfato se añaden a los detergentes para ablandar el agua ya que forman complejos solubles con iones Ca, Mg y hierro, evitan que se formen espumas insolubles en el agua y permiten que los surfactantes trabajen más eficazmente impidiendo que la suciedad se deposite de nuevo en la ropa. Otro papel de estos compuestos es hacer algo alcalina el agua de lavado. En un principio se añadían grandes cantidades de *tripolifosfato de sodio* (TPS), Na₅P₃O₁₀. El TPS actúa como ligando quelato; los complejos resultantes son muy estables y, normalmente, no liberan sus iones metálicos.

El ión tripolifosfato, es una base débil en disolución acuosa procura el ambiente alcalino requerido para un lavado efectivo: $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-} + \text{OH}^-$

Desgraciadamente el exceso de polifosfato en el agua se transforma en ión fosfato, PO_4^{3-} ("ortofosfato"): $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{PO}_4^{3-} + 4\text{H}^+$

Hoy en día se restringe el uso de fosfatos en detergentes. El TPS ha sido reemplazado por *nitriloacetato de sodio* (NTA).

Fundamento y objetivo.

DETERMINACIÓN DE FOSFATOS POR COLORIMETRÍA (MÉTODO AMARILLO DEL ÁCIDO VANADO-MOLIBDO-FOSFÓRICO).

Un grupo de compuestos muy útiles en análisis fotométrico es el de los **heteropoliácidos**. El prototipo de ellos es el ácido molibdo-fosfórico $\text{H}_3[\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3]$. En una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdo-fosfórico. En presencia de vanadio forma ácido vanado-molibdo-fosfórico **amarillo**. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfatos.

Equipamiento y reactivos.

Espectrofotómetro UV-visible y cubetas de 2 cm de paso óptico.

Material de vidrio habitual de laboratorio: vasos, probetas, matraces, pipetas, etc.

Equipo de filtración y papel de filtro.

Solución acuo-alcohólica de fenoltaleína al 1%.

Ácido clorhídrico 1:1. Se puede utilizar H_2SO_4 , HClO_4 o HNO_3 debido a que la concentración ácida no es crítica para la determinación, pero se recomienda una concentración final en la muestra de 0,5N.

Carbón activado. Lo utilizamos para eliminar las partículas finas por lavado con agua destilada.

Reactivo vanadato-molibdato.

Solución A: Se disuelven 25 g de molibdato amónico, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, en 300 ml de agua destilada o desionizada.

Solución B: Se disuelven 1,25 g de metavanadato de amonio, NH_4VO_3 , calentando hasta ebullición en 300 ml de agua destilada o desionizada. Dejar enfriar y añadir 330 ml de HCl concentrado. Una vez enfriada la solución B a temperatura ambiente, verter la solución A sobre la B, mezclar y diluir a 1 L.

Solución patrón de fosfatos. Disolver 219,5 mg de KH_2PO_4 anhidro P.A. en agua destilada y diluir a 1000 ml, donde 1 ml equivale a una concentración de 50,0 mg de PO_4^{3-} - P

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

Se deben realizar los siguientes pasos previos para eliminar interferencias y conservar la muestra: ajustar el pH de la muestra; si el pH de la muestra es mayor de 10, añadir 0,05 ml (una gota) de indicador de fenolftaleína a 50,0 ml de muestra y decolorar el color rojo con HCl 1+1 antes de diluir a 100 ml. Eliminar el color de la muestra; se elimina el excesivo color de la muestra agitando unos 50 ml con 200 mg de carbón activado en un matraz Erlenmeyer durante 5 minutos y filtrando para eliminar el carbón.

Desarrollo de color en la muestra: tomar 35 ml de muestra o menos que contenga de 0,05 a 1,0 mg P, en un matraz aforado de 50 ml. Añadir 10 ml de reactivo vanadato-molibdato y diluir hasta la señal con agua destilada. Preparar un blanco compuesto de 40 ml de disolución de vanadomolibdato amónico en 100 ml de agua (atención el reactivo colorimétrico presenta cierta coloración).

Al cabo de 10 minutos como mínimo, se mide la absorbancia de la muestra frente a un blanco a longitud de onda de 400 a 490 nm en función de la sensibilidad deseada. Como opción usar la longitud de onda de 420 nm.

El color es estable durante días y su intensidad no es afectada por las variaciones de la temperatura ambiente.

Obtención de la curva de calibrado: preparar una curva de calibrado utilizando volúmenes adecuados de solución patrón de fosfato y procediendo como el apartado anterior. Cuando el ion Fe^{3+} sea suficiente bajo para no interferir, elaborar un conjunto de rectas de calibrado de una serie de soluciones patrón para varias longitudes de onda. Esta acción permite una amplia gama de concentraciones en una serie de determinaciones. Analizar, al menos, un patrón con cada juego de muestras.

Informe y resultados.

Para determinar la concentración de P expresados en mg/L se aplica el siguiente cálculo:

$$\text{mg P/L} = \frac{50 \text{ mg P (en 50 mL volumen final)} \cdot 1000}{\text{mL muestra}}$$

Cuestiones.

- 1.- ¿Por qué se añade vanadato amónico?
- 2.- Justificar el empleo de cubetas de 2 cm de paso óptico.
- 3.- ¿Cuál es el rango de pH adecuado y que iones pueden interferir?

PRÁCTICA V-UV 02 BIS. DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS. Análisis de un aditivo alimentario E339, 340, 341.

Introducción.

Los fosfatos se agregan comúnmente a productos cárnicos, por lo que hay que considerar sus propiedades funcionales en la elaboración de cárnicos además de las de aumento en retención de agua y mejoramiento de la estabilidad de la emulsión.

La acción de los fosfatos en carne se puede explicar de diferentes maneras. Primero, los fosfatos pueden afectar la capacidad de ligar el agua del músculo post-rigor al incrementar el pH del músculo, lo cual aumenta las cargas negativas netas en el mismo y estas aumentan la repulsión electrostática entre fibras y finalmente aumenta la hidratación del músculo. A pesar de que la mayoría de los fosfatos aumentan el pH de la carne, la relación entre pH y capacidad de ligar agua varía de acuerdo a cual se use. En varios países están permitidos los fosfatos en productos cárnicos ya sea en productos de músculo entero y salchichas, a un nivel por lo general del 0.5%, como lo es en EUA, México y en la UE de acuerdo al reglamento de aditivos para algunos preparados de carne (*breakfast sausages*), para productos cárnicos elaborados no tratados y tratados térmicamente.

Tabla 2. pH de Fosfatos Inorgánicos disueltos en agua

Fosfatos	pH
Fosfato Trisódico	12.0
Pirofosfato Tetrasódico	10.2
Tripolifosfato de Sodio	9.8
Hexametáfosfato de Sodio	7.0
Pirofosfato de Sodio Ácido	4.2

Los fosfatos alcalinos son suaves respecto a la pérdida por cocimiento en productos cárnicos; mejorarán la estabilidad de la emulsión y el ligamiento de pedazos de carne en productos de carne cortados y embutidos; además protegen la emulsión de los productos de variaciones en temperaturas de emulsión y cocimiento.

Los fosfatos alcalinos exhiben un pH alto en agua, pero ya que la carne es buffer en sí, el efecto de los fosfatos en el pH de la carne es considerablemente menor que en el agua. Aún un aumento limitado en el pH (aproximadamente de 0.6 unidades máximo) aumenta la capacidad de ligar agua y la solubilidad de la proteína.

El pirofosfato tetrasódico sirve para disociar o separar el complejo actomiosina en sus partes: actina y miosina. Esto es muy ventajoso, ya que en si la miosina se disuelve fácilmente a los niveles de sal que se usan comúnmente en el procesamiento de productos cárnicos en comparación del complejo actomiosina, y es más benéfico que la actomiosina para la emulsión y unión de productos cárnicos.

Añadir la forma de pirofosfato directamente a la carne (en lugar de los tripolifosfatos) debería producir mayor calidad de exudado más rápidamente que los tripolifosfatos, ya que los tripolifosfatos necesitan de cierto tiempo para hidrolizarse a la forma pirofosfato.

La adición de fosfatos alcalinos ha demostrado tener el mayor efecto en el porcentaje relativo de las proteínas miofibrilares en el exudado de jamones masajeados; ayudan a la solubilidad de proteínas aún sin sal; sin embargo la sal y el masajeado mejoran dicha solubilidad. Además reducen significativamente las pérdidas en el cocido cuando se añaden a jamones masajeados. Los fosfatos exhiben diferencias en cuanto a su solubilidad. En general, la relativa insolubilidad de los fosfatos sódicos en agua llega a causar problemas en la salmuera. Por esta razón, el pirofosfato tetrasódico casi nunca se utiliza en la elaboración de jamones o tocinetas. El problema de la insolubilidad no es tan apremiante cuando se fabrican productos emulsionados, especialmente si se dispone de *cutter* para llevar a cabo el proceso. No obstante, de vez en cuando aparecen cristales de pirofosfato tetrasódico en pastas emulsionadas precocción, no así post-cocción.

En términos de efectos en sabor de los fosfatos, algunos investigadores han indicado que los fosfatos, particularmente a niveles altos, producen sabores amargos o “jabonosos”. Para los niveles de fosfato por debajo de los límites aprobados (ej., 0.3%), sólo en el caso del pirofosfato tetrapotásico se ha notado un resabio no deseado en los productos emulsionados. A un nivel máximo, el pirofosfato tetrasódico produjo un sabor ‘metálico’ en salchichas Frankfurt cuando el producto se sacó de la cámara de ahumado; sin embargo, cuando está empacado al vacío y almacenado durante 60 días, se determinó que un producto tratado con fosfatos es ligeramente preferido por el panel integrado por consumidores sobre el producto convencional al que no se le añadió fosfato.

Los polifosfatos también se *quelatan* (enlazan) con cationes divalentes (calcio, magnesio o hierro) en suministros de agua dura y en carne (lo que aumenta la retención del agua en carne). Mientras que esto permite a los fosfatos servir como suavizantes de agua, una vez que los fosfatos hayan enlazado cationes, su capacidad para aumentar la capacidad de ligar agua en carne se reduce.

Quelar cationes en el músculo puede inhibir también la rancidez oxidativa y disminuye la velocidad de disminución de color en carne curada. Si no hay disponible agua destilada o desionizada, el tipo de agua disponible podría indicar el tipo de fosfato que se debe añadir a la carne. A los valores de pH del músculo, a los cuales se añaden los fosfatos, el hierro se enlaza mejor por el pirofosfato tetrasódico, mientras que el magnesio y calcio se enlazan mejor por el hexametafosfato.

Los aniones de fosfatos también actúan como polielectrolitos para aumentar la fuerza iónica. Añadir electrolitos causará un aumento en la retención del agua por el enlace directo del agua con los aniones de fosfato y por la repulsión de los grupos de proteína debido al aumento y predominio de cargas negativas en tales grupos. Estos efectos de repulsión abren la estructura de la proteína, y aumentan el número de sitios disponibles para enlazar agua, lo cual permite que se contenga más de ésta en la carne.

La mayor carga negativa de la proteína puede también causar una mejor distribución de las partículas de grasa en productos emulsionados, a causa del aumento de la dispersión de la proteína a través de la mezcla. Una mejor distribución de las partículas de grasa puede prevenir la aglomeración de éstas que puede ocurrir durante un picado excesivo, y subsecuente salida de la grasa del producto terminado.

La quelación de los cationes por fosfatos alcalinos protege a las carnes cocidas de sabores a sobre-cocido, y también estabilizan el color en productos curados.

Otro efecto de los fosfatos es que permiten aumentar el tiempo de picado con un menor aumento de temperatura. Se ha demostrado que las emulsiones hechas añadiendo pirofosfato tetrasódico requieren más tiempo de picado para alcanzar la temperatura especificada que las emulsiones hechas sin él; este tiempo extra de picado podría aumentar la estabilidad de la emulsión por incremento en la extracción de proteína

Principio

Transformación en ácido pirofosfórico, posterior hidrólisis del mismo y medida de la intensidad de color producido al añadirle el reactivo molibdato - vanadato, por espectroscopía de absorción en el visible. Este método se basa en la producción de un color amarillo naranja estable, debido al complejo vanadio molibdifosfórico ($H_3PO_4 \cdot VO_3 \cdot 11MoO_3 \cdot n H_2O$) que se forma al tratar una solución ácida de ortofosfatos con un reactivo ácido que contiene ácido molíbdico y ácido vanádico.

Material y Reactivos

Espectrofotómetro capaz de medir a 400 nm.

Mufla para operar a 550 °C – 600°C.

Cápsulas de porcelana.

Matraces aforados de 50 ml.

Material general de laboratorio.

Solución de molibdato amónico: 20 g de molibdato amónico tetrahidrato P.A.en 200 ml de agua desionizada caliente.

Solución de metavanadato amónico: 1 g de metavanadato amónico P.A. en 300 ml de agua desionizada caliente, enfriar y añadir 140 ml de ácido nítrico concentrado PA.

Solución de metamolibdovanadato: verter lentamente y agitando la solución de molibdato amónico sobre la solución de metavanadato amónico. Enrasar a 1 litro con Agua desionizada.

Ácido nítrico concentrado PA.

Ácido sulfúrico concentrado PA.

KH_2PO_4 calidad P.A. al menos (desechado previamente unas 2h a 150°C y almacenado en desecador), para preparar la curva patrón.

Procedimiento.

Preparación de la curva patrón: disolver 4,3930 g de fosfato monopotásico, previamente secado. Añadir 2 ml de ácido sulfúrico y diluir a 1 L. Esta solución contiene 1 mg/ml (A). Diluir 10 ml de esta solución en 250 ml (B) y preparar las siguientes diluciones:

1) A partir de la solución (B) tomar: 5 ml, 7 ml, 10 ml, 15, 20 ... 50 ml y llevarlos a 50 ml con agua destilada.

2) A partir de la solución (A) tomar: 3ml, 3.5 ml, 4 ml, 4.5 ml... 9 ml y llevarlos a 50 ml con agua destilada

De esta manera tendremos: 0.2, 0.28, 0.40, 0.60, 0.80, 1.20, 1.60, 2.00, 3.00, 3.5, 4, 4.5, 5, 7.5, 8, 9 mg de fósforo en 50 ml.

A continuación tomamos 5 ml de cada patrón y añadimos 10 ml de reactivo colorimétrico y lo llevamos a 50 ml. Medir frente a un blanco a los 30 minutos, a una longitud de onda de 420 nm.

Preparación de la muestra: Tomar una muestra de 2 a 2.5 g de carne triturada y homogeneizada en una cápsula o crisol de porcelana. Humedecerla con unos mililitros de solución de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y evaporar. Llevar a cenizas a una temperatura de 550° a 600°C hasta cenizas blancas. Recoger las cenizas añadiendo a la cápsula 2 ml de nítrico concentrado y 6 ml de clorhídrico concentrado.

Calentar en placa calefactora con agitación durante al menos 10 min y verter con mucho cuidado a través de embudo con filtro en un matraz aforado de 50 ml. Aforar con agua destilada.

Para medir el fósforo, tomar 5 ml de la solución final y proceder como en la curva patrón, añadiendo 10 ml de reactivo colorimétrica y llevando a 50 ml con agua destilada. Leer en espectrofotómetro a 420 nm tras 30 minutos de reposo.

Cálculos

Los resultados se obtienen en mg de fósforo en 50 ml.

$$\text{Concentración de fósforo (mg/100 g)} = 2 \cdot V \cdot C/P$$

Siendo:

V= volumen del matraz en que se recoge la muestra (ml)

C= concentración registrada en el espectrofotómetro (mg/50 ml)

P= peso de la muestra que pusimos en el crisol de porcelana (g)

Para calcular la concentración de fosfatos en la forma P_2O_5 en mg/100g multiplicamos por 2,29 el resultado anterior.

PRÁCTICA V-UV 03. Medida espectrofotométrica de la turbidez en aguas. Control de la calidad del agua para uso doméstico, industrial y ambiental.

Introducción y justificación teórica.

La transparencia del agua es importante tanto desde el punto de vista del consumo directo como para la elaboración de productos y para numerosos usos industriales. Los fabricantes de bebidas, los procesadores de alimentos y los tratamientos de aguas confían en la clarificación, la coagulación y el filtrado para conseguir productos aceptables.

La turbidez de una muestra de agua, es la reducción de su transparencia ocasionada por partículas en suspensión. Este material puede ser arcillas, limos, cieno, materias orgánicas e inorgánicas finamente divididas, compuestos orgánicos solubles coloreados, plancton y otros microorganismos, etc. que se mantienen en suspensión por su naturaleza coloidal o por la turbulencia que genera el movimiento. Por esta misma razón, la turbidez debe medirse directamente en campo o en su defecto, dentro de las 24 horas siguientes al muestreo.

La turbidez es una manifestación de la propiedad óptica que origina que la luz se disperse y absorba en vez de transmitirse en línea recta a través de la muestra. La correlación de la turbidez con la concentración en peso de la materia en suspensión es difícil de establecer, ya que en la dispersión luminosa intervienen el tamaño, la forma y el índice de refracción de las partículas. Partículas ópticamente negras como las de carbono activado, pueden absorber luz y aumentar significativamente las cifras de turbidez.

La intensidad I de luz transmitida a través de la cubeta con muestra está relacionada con la concentración C del material en suspensión por una ecuación análoga a la Ley de *Beer-Lambert*:

$$S = \log I_0 / I = k \cdot b \cdot C$$

Donde k es el coeficiente de turbidez, b espesor de cubeta y C concentración sólidos.

El coeficiente de turbidez como se ha comentado, depende del diámetro y geometría de la partícula, de la longitud de onda y del índice de refracción de las partículas y del medio en que se encuentran.

Estrictamente hablando, esta ecuación es válida solo para pequeñas partículas donde la *dispersión Rayleigh* es el único mecanismo de atenuación y solo para bajas concentraciones de partículas en suspensión, donde la dispersión múltiple es poco probable.

En lo que respecta al consumo humano, la turbidez confiere al agua mal aspecto, un tratamiento inadecuado y suele ser sospechosa de algún tipo de contaminación, especialmente bacteriológica.

En lo que respecta al medio ambiente acuático, mientras que algunas especies de peces requieren agua totalmente transparente para sus supervivencia, otras no se ven afectadas apreciablemente por la turbidez del medio.

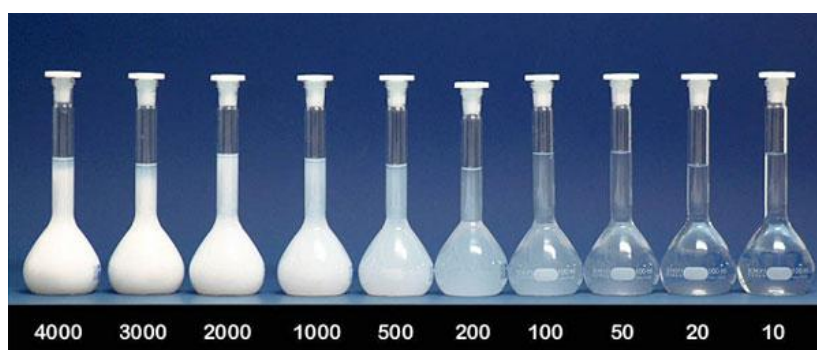
También es importante el control de turbidez en agua de piscinas, albercas, estanques, etc. En industria alimentaria control de turbidez en cervezas y vinos, etc.

Fundamento y objetivo.

El método de medida suele ser *nefelométrico*, es decir medición a 90° de la luz dispersada, aunque en este caso por mayor disponibilidad y más generalizado se emplea un **método turbidimétrico**, utilizando un espectrofotómetro visible-UV. Se parte de la hipótesis de que cuanto mayor es la dispersión de la luz, mayores el contenido en sólidos suspendidos y en consecuencia mayor turbidez de la muestra.

En 1926, se comenzaron a utilizar las soluciones de *formacina*, ya que se presentaban como más constantes y fácilmente reproducibles. Llevar estas mediciones al laboratorio con estándares referenciales primarios de turbidez era recomendado para representar más fielmente las propiedades reales de difusión y crear un estándar referencial más uniforme. Las unidades basadas en soluciones primarias como el formazin son comúnmente usadas en la actualidad y son la base de las Unidades de Turbidez Formazin (FTU por sus siglas en inglés) de la Agencia de Protección Ambiental estadounidense EPA.

FTU es una medición que no especifica ángulo y puede realizarse en cualquier ángulo de detección, aunque ambas la EPA y la ASTM dictan ángulos de medición a 90°. Las *Unidades de Turbidez Nefelométricas* (**NTU** por sus siglas en inglés) específicamente detallan una técnica de medición a 90° y también están basadas en formazin, aunque existen suspensiones de polímeros en suspensión más estables disponibles en el mercado, y se reconocen como una alternativa aceptable.



Estándares de formacina expresados en NTU/FTU.

Están siendo utilizadas más unidades de medida de turbidez, específicas en la industria, como las **unidades Helms** (formazin).

Las organizaciones de industria cervecera como la *Convención Cervecera Europea* (EBC) y la *Sociedad Americana de Químicos de la Cerveza* (ASBC-FTU) emplean sus propias escalas de unidades de turbidez basadas en formazin. Si bien las unidades EBC se utilizan comúnmente como medidas de luz difusa frontal y lateral, ASBC FTU se realiza estrictamente a 90°. Las partes por millón de sustancia estándar, como PPM de tierra de diatomeas (diatomita), también se utilizan ya que representan un promedio del tamaño partículas deseables para la mayoría de las aplicaciones. Debido a la sensibilidad y selectividad de las partículas que presentan los distintos ángulos de difusión, y la unicidad de diseño de los distintos instrumentos de turbidez, las correlaciones entre instrumentos de distintas técnicas de medición, o diferentes fabricantes, son difíciles y a veces imposibles de lograr, a menos que los componentes de la turbidez sean uniformes y homogéneos. La repetibilidad precisa de los instrumentos es esencial.

Equipamiento y reactivos.

Espectrofotómetro para leer a 420 nm o más adecuado turbidímetro.

Celdas fotométricas o cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico.

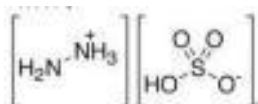
Vasos de precipitados.

Pipetas 10 ml clase A.

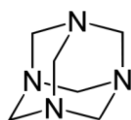
Matraces aforados de 100 ml y material general de laboratorio.

Balanza analítica.

Sulfato de hidracina. Disuelva 1,0 g de sulfato de hidracina (**manejar con mucho cuidado, evitar inhalación, ingestión y contacto con la piel**) en agua desionizada y diluir a 100 ml en matraz aforado.



Hexametilentetramina. Disuelva 10,00 g de hexametilentetramina en agua desionizada y diluya hasta 100 ml en matraz aforado.



Suspensión patrón de formacina. Mezclar 5 ml de la solución de hidracina y 5 ml de la solución de hexametilentetramina en un matraz aforado de 100 ml y mantener a temperatura ambiente (aprox. 25°C) durante 24 horas. Pasado este tiempo se habrá formado un precipitado blanco. Enrasar a 100 ml y agitar vigorosamente. Se debe preparar mensualmente. A esta solución se le asigna un valor de **400 UNT** (Unidades Nefelométricas de Turbidez).

Suspensión de turbidez estándar. Dilúyanse 10 ml de suspensión patrón de formacina hasta 100 ml con agua desionizada. La turbidez de esta suspensión se considera de 40 UNT.

Estándares diluidos de turbidez. Dilúyanse porciones de la suspensión de turbidez estándar en agua desionizada según se requiera, en un rango de 0 a 40 UNT.

Muestra problema a analizar. Tómese una muestra de agua de río o piscina o similar..

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

Preparar la curva de calibrado con los estándares diluidos. Homogeneizarlos antes con una agitación suave. Procurar que en la cubeta de medida del espectrofotómetro no queden burbujas. Medir a 400 nm empleando como blanco agua destilada.

Obtener la turbidez de la muestra a partir de la recta de calibrado. Si la turbidez es superior a 40 UNT diluir convenientemente con agua desionizada.

Informe y resultados.

UNT= [A · (B+C)] / C donde A= UNT encontradas en muestra diluida.

B= volumen (ml) de agua de dilución.

C= volumen (ml) de la muestra tomada para dilución

Cuestiones:

- 1.- ¿Qué diferencia existe entre *turbidimetría* y *nefelometría*?
- 2.- ¿Bajo que hipótesis trabajan ambas técnicas?
- 3.- Cite otros patrones de turbidez.
- 4.- Interés de medir la turbidez en la industria cervecera y en enología. Causas de la misma.

PRÁCTICA V-UV 03 BIS. DETERMINACIÓN TURBIDIMÉTRICA DE SULFATOS EN AGUAS POTABLES.

Introducción y justificación teórica.

El sulfato se distribuye ampliamente en la naturaleza y puede presentarse en aguas naturales en concentraciones que van desde unos pocos a varios miles de miligramos por litro. Los residuos del drenado de minas pueden aportar grandes cantidades de $\text{SO}_4^{=}$ debido a la oxidación de la pirita, también fenómenos como la lluvia ácida pueden aumentar su concentración en aguas superficiales. Los sulfatos de sodio y magnesio ejercen una acción catalítica e incrementan procesos de corrosión.

El ión sulfato $\text{SO}_4^{=}$ se precipita con ión Ba^{++} , en condiciones tales que se formen cristales de tamaño uniforme de BaSO_4 , que se deben mantener en suspensión homogénea durante un período de tiempo que resulte suficiente para medir la absorbancia que la misma produzca. En esta ocasión nos valemos de la intensidad de radiación transmitida por la suspensión. La radiación transmitida se relaciona con la concentración de la materia en suspensión mediante una ecuación del tipo: $S = k \cdot b \cdot C$, donde S sería la turbidancia debida a la dispersión, k es una constante de proporcionalidad y b el camino óptico. En algunas ocasiones se usa otra constante de proporcionalidad denominada turbicidad τ , e igual a 2,303 k El valor de la constante de proporcionalidad depende del tamaño y forma de las partículas, de la longitud de onda y de los índices de refracción de las partículas en suspensión y del medio. Esta ecuación solo es rigurosamente válida para partículas pequeñas, que presentan solo dispersión Rayleigh, y para bajas concentraciones de materia en suspensión, aunque no demasiado diluida. En la práctica, los análisis deben realizarse mediante una curva de calibrado en la que se represente S frente a concentraciones conocidas de materia dispersante. El contenido en $\text{SO}_4^{=}$ de cada muestra problema a analizar se obtiene de la curva de calibrado previamente obtenida.



Fundamento y objetivo.

El método se basa en la medida de la turbidez producida por la reacción de precipitación del ion sulfato con una sal de bario en medio ácido. La precipitación se lleva a cabo en condiciones tales que se forman cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme, que deben mantenerse en suspensión homogénea un periodo de tiempo suficiente para medir la turbidez.



Equipamiento y reactivos.

Espectrofotómetro vis-UV ó turbidímetro y cubetas de 1 cm.

Balanza analítica

Matraces aforados de 50 ml

Matraces aforados de 100 ml

Matraces aforados de 1 litro

Pipetas graduadas 1, 5, 10 y 25 ml

Material general de laboratorio

Acido acético glacial P.A.

Cloruro de bario P.A.

Sulfato sódico anhidro P.A.

Goma arábiga en polvo Q.P.

Agua desionizada, exenta de sulfatos

Preparación de reactivos.

Disolución madre patrón de sulfato de 1000 ppm. Disolver 1,4792 g de sulfato sódico anhidro en agua destilada y enrasar hasta 1 litro.

Disolución patrón de sulfato de 100 ppm. Llevar 10 ml de la disolución anterior a un matraz aforado de 100 ml y enrasar con agua destilada.

Disolución de goma arábiga al 5%. Disolver 5 g de reactivo sólido en agua caliente, enrasando a unos 100 ml. Dejar enfriar.

Disolución de cloruro de bario estabilizado. Disolver 10 g de cloruro de bario en 20 ml de disolución de goma arábiga y enrasar hasta 100 ml. Dejar reposar durante 1 hora, filtrar.

Disolución de ácido acético 1/10. Preparar la disolución a partir de ácido acético glacial PA.

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

En una serie de matraces numerados de 50 ml añadir sucesivamente en el siguiente orden:

Nº de matraz	B	1	2	3	4
Disolución patrón de 100 ppm de SO_4^{2-}	0 ml	5 ml	7,5ml	10ml	15ml
Agua destilada o desionizada (ml)	20	20	20	20	20
Ácido acético 1/10 (ml)	1	1	1	1	1
Disolución cloruro bario estabilizada (ml)	5	5	5	5	5
Concentración mg/l de SO_4^{2-}	0	10	15	20	30

Agitar 2 ó 3 veces energéticamente. Dejar reposar 15 minutos, agitar de nuevo y efectuar las lecturas en espectrofotómetro frente al blanco de referencia a la longitud de onda de 650 nm.

Determinación de sulfatos en agua problema. En un matraz de 50 ml introducir sucesivamente, en el siguiente orden: 10 ml del extracto acuoso (agua problema), 20 ml de agua destilada, 1 ml de disolución de ácido acético y 5 ml de disolución de cloruro de bario estabilizada. Agitar 2 ó 3 veces energéticamente. Dejar reposar 15 minutos, agitar de nuevo y efectuar las lecturas en espectrofotómetro frente al blanco de referencia a la longitud de onda de 650 nm.

Informe y resultados.

Determinar la concentración de sulfatos en la muestra de agua a partir de la recta de calibrado. Expresar la concentración de sulfatos como mg de SO_4^{2-} / litro.

Bibliografía:

- 1.- Métodos Analíticos en Alimentaria. Aguas. Métodos Oficiales de Análisis Químicos y Biológicos. Montplet & Esteban, S.A. (1987)
- 2.- APHA, AWWA, WPCF. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos (1992)
- 3.- Eugene D. Olsen. Métodos Ópticos de Análisis. Ed. Reverté (1990).
- 4.- Alonso-Felipe, J.V., Pinto Cañón G. "Industrial Control of the filtration in the beer manufacturing Process". SPECTROSCOPY LETTERS 22(4), 489-495 (1989).
- 5.- http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica.

Observaciones.

- 1.- Si la lectura de una muestra sobrepasa la máxima concentración que figura en la curva de calibrado ó da un valor muy bajo en dicha curva deberá repetirse el ensayo.
- 2.- No se indican las concentraciones mínima y máxima, entre las que el método resulta válido, porque ello depende en gran medida del instrumento de medida que se utilice y del paso de luz de la cubeta empleada.
- 3.- Como se ha comentado en esta técnica interfieren fundamentalmente el color y la turbidez. Esta puede eliminarse por filtración ó centrifugación. La interferencia del color puede suprimirse utilizando la muestra coloreada como referencia, al que no se le agrega reactivo para desarrollar turbidez o decolorar filtrando a través de carbón activo.

PRÁCTICA V-UV 04. Los nitritos y nitratos como aditivos conservantes. Medida por espectrofotometría visible del contenido en nitritos en productos cárnicos.

Introducción y justificación teórica.

Las sales sódica y potásica de nitrato y nitrito se utilizan como aditivos conservadores en alimentos, especialmente en productos cárnicos, donde el nitrito impide eficazmente el desarrollo de las esporas de *Clostridium botulinum* y por lo tanto la formación de la toxina botulínica. Asimismo, contribuyen al desarrollo del aroma y estabilización del color característico de este tipo de productos. Las cantidades máximas permitidas por la legislación dependen del tipo de compuesto (ver tabla) y del alimento al que se destine, oscilando entre **50 y 150 mg/kg para nitrito** y entre **125 y 300 mg/kg para nitrato** (expresados en forma de las correspondientes sales). Cuando se utilizan conjuntamente, los niveles máximos permitidos son inferiores a la suma de las cantidades individuales correspondientes.



Códigos UE de identificación de nitrato y nitrito como aditivos alimentarios:

Nitrito potásico E-249

Nitrito sódico E-250 (*)

Nitrato sódico E-251

Nitrato potásico E-252 (*)

(*) Suelen ser los más frecuentes en embutidos.

El nitrato puede transformarse en nitrito por reducción bacteriana tanto en los alimentos (durante el procesado y almacenamiento), como en el propio organismo (en la saliva y tracto gastrointestinal). Se estima que un 5% del nitrato ingerido se transforma en nitrito endógenamente, lo que supone la fracción mayoritaria de la exposición global a este compuesto.

La carne puede protegerse de la putrefacción bacteriana mediante la adición de soluciones concentradas de sal común. Pero la carne que está conservada únicamente con cloruro sódico toma un color pardo-verdoso atribuible a la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina.

Para que se mantenga el color rojo se añade al cloruro sódico para salazones una pequeña cantidad de nitrito o nitrato, parte del cual se transforma lentamente en nitrito. El nitrito forma *nitrosohemoglobina* o *nitrosohemocromógeno*, de color rojo oscuro. Las concentraciones de nitrito sódico en salazones varían del 0.04 al 10%, dependiendo del tratamiento que se dé y del tipo de carne.

Los nitratos se emplean como aditivos en la fabricación de productos cárnicos curados y, en menor medida, en la conservación del pescado y en la producción de queso. Además de proporcionar color adecuado a la carne, los nitritos tienen otros efectos sobre los alimentos: retrasa el proceso de oxidación de los lípidos, con la consecuente disminución del característico olor de enranciamiento, produce una mayor firmeza en la textura, y provee a los alimentos de un importante efecto antimicrobiano (especialmente frente a *Clostridium botulinum* y sus toxinas).

Además de como aditivos, los nitratos como sustancias de origen natural pueden encontrarse en productos cárnicos frescos, leche y productos lácteos, cereales, frutas, bebidas alcohólicas y verduras. En la mayoría de estos alimentos se encuentran en bajas concentraciones, generalmente inferiores a 10 mg/kg y rara vez exceden los 100 mg/kg. Sin embargo, las verduras, principal aporte de estos compuestos en la dieta junto con los embutidos, presentan unos contenidos que oscilan entre 200 y 2.500 mg/kg, variando en función del procesado del alimento, uso de fertilizantes y condiciones de crecimiento.

La **Ingesta Diaria Aceptable (IDA)** de nitratos recomendada por el comité conjunto de la FAO/OMS es de 0 - 3.7 mg/kg peso corporal. Puesto que la toxicidad de los nitratos proviene de su conversión en nitritos y su posible formación endógena en N-nitrosocompuestos, deberá tenerse en cuenta también la IDA de nitritos, fijada en 0-0.06 mg/kg de peso corporal. El empleo de nitrito como aditivo en alimentos infantiles para niños menores de tres meses no está permitido.

Según los datos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA en inglés), la concentración de nitritos a la que se atribuye una buena actividad conservante es de 300 mg/kg, no obstante, esta concentración tiende a disminuir con el tiempo, una cuestión que podría constituir un evidente peligro si consideramos la formación potencial de toxina botulínica. La concentración puede disminuir drásticamente desde los 300 mg/kg añadidos hasta niveles inferiores a 10 mg/Kg en tan sólo cinco días. Esta disminución es especialmente peligrosa si las temperaturas de conservación son elevadas (hasta 35°C). Si la temperatura de mantenimiento es de refrigeración, se puede mantener la concentración más o menos estable entre una y tres semanas. Sin embargo, no por poner mayor cantidad de nitratos o de nitritos se consigue mantener sus niveles durante más tiempo. La concentración residual, de hecho, depende también de otros factores como el pH, la temperatura de conservación o la presencia de ascorbatos y fosfatos.

Aunque la presencia de nitratos y nitritos en los alimentos puede constituir un riesgo para la salud humana por la formación de **nitrosaminas**, su eliminación de la lista de ingredientes como aditivos puede constituir un peligro mayor por su efecto limitante de *clostridios* formadores de toxinas. Por este motivo, desde la UE se han fijado, tras numerosos estudios, las concentraciones máximas tolerables para cada producto de modo que garanticen su eficacia antimicrobiana. El objetivo es decantar la balanza a favor de los efectos positivos frente a los negativos.

Dentro de países de la Unión Europea, Dinamarca tiene una legislación específica y rigurosa sobre los nitritos como aditivos.

Fundamento y objetivo.

Al reaccionar el nitrito presente en el extracto del producto cárnico con el reactivo de **ácido sulfanílico α -naftilamina** se produce una reacción colorimétrica con la formación de un compuesto de color rosado, de tal modo que la intensidad de color es proporcional a la cantidad de nitrito presente en la muestra. La concentración se determina tras medir la absorbancia mediante colorimetría o espectrofotometría y comparar con una recta patrón.

En medio ácido, el nitrito reacciona con la sulfanilamida para producir una sal de diazonio, la cual reacciona a su vez con el dicloruro de N-naftol-1-etilendiamino (N-NEDA), una amina aromática, para dar lugar a un compuesto rosa fucsia de intensidad proporcional a la concentración de nitrito.

Se trata de realizar un ensayo comparativo de control de calidad de grado de cumplimiento de la normativa de una serie de marcas comerciales de charcutería en cuanto a su contenido en nitritos y ver si cumplen o no los límites contemplados en la normativa vigente (Código Alimentario Español).

Equipamiento y reactivos.

Matraces aforados de 100 y 1000 ml de capacidad.

Probetas de 100 o 200 ml de capacidad.

Baño María o placas calefactoras.

Papel de filtro plegado de 15 dm de diámetro.

Tubos de ensayo de 150 x 25 mm.

Matraces Erlenmeyer de 300 ml de capacidad.

Espectrofotómetro capaz de leer a 520 nm.

Cubetas de 1 cm de paso específicas para luz visible.

Reactivos de Carrez:

Solución acuosa de ferrocianuro potásico (Potasio Hexacianoferrato II 3-hidrato PA) de concentración 15% (w/v) disolver en vaso precipitados y diluir convenientemente, p.e. a 100 ml.

Solución acuosa de acetato de zinc (Zinc Acetato 2-hidrato PA) al 30% (w/v) disolver y diluir convenientemente p.e. a 100 ml en matraz aforado.

Solución patrón de nitrito sódico: Pesar, con aproximación de 1 mg, 1 g de nitrito sódico PA, disolver en agua desionizada y completar hasta 1000 ml. Tomar con la pipeta 5 ml de esta solución e introducirla en otro matraz aforado de 1000 ml. Enrasar.

Reactivo colorimétrico:

- **Solución I:** Disolver calentando al baño María 6 g de **ácido sulfanílico** PA en 200 ml de ácido acético glacial y 400 ml de agua destilada o desionizada. Añadir 200 ml de una solución de cloruro sódico que contiene 100 g/l de cloruro sódico PA. Diluir con agua hasta 1000 ml.
- **Solución II:** Disolver calentando al baño María o en placa calefactora procurando que la temperatura no supere 80°C, 0.3 de **cloruro de a naftilamina** en 100 ml de agua destilada. Filtrar si es necesario y añadir 200 ml de acético glacial. Diluir hasta 1000 ml con agua destilada. Manipular con precaución esta disolución por su carácter cancerígeno. Ambas soluciones deben conservarse en frascos topacios (opacos) bien cerrados. El reactivo colorimétrico se obtiene mezclando volúmenes iguales de ambas soluciones.

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO. Pesar, con precisión de 1 mg, un peso P (aproximadamente 10 g) de la muestra cárnica previamente picada y convenientemente homogeneizada, introducirla en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 200 ml de agua desionizada y adicionar consecutivamente 5 ml de cada uno de los reactivos de Carrez y agitar calentando suavemente. Agitar durante 2 horas. Dejar 10 minutos en reposo y filtrar a través filtro pliegues. Lavar varias veces el residuo con pequeñas porciones mezcla 1:1 agua- etanol. Evaporar hasta 250 ml.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Del extracto obtenido, tomar 25 ml y añadir 1 g aproximadamente de carbón activo, caso de que sea necesario decolorar la muestra. Filtrar hasta que el filtrado sea transparente. Del filtrado tomar una alícuota de 10 ml medida exactamente y ponerla en un tubo de ensayo. Añadir 10 ml del reactivo colorimétrico, mezclar y dejar reposar la solución 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

A partir de 20 minutos y antes de 4 horas, medir la densidad óptica de la solución en una cubeta de 1 cm de paso de luz a **520 nm** de longitud de onda. Si la solución coloreada problema presenta una coloración superior a la de la solución patrón más concentrada, tomar una alícuota menor de 10 ml. Efectuar dos determinaciones de la misma muestra.

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN. Tomar de la solución patrón, alícuotas de 5, 10 y 20 ml, llevar a 100 ml con agua en matraces aforados. El contenido de estas soluciones es respectivamente, de 0.25, 0.50 y 1ppm de nitrito sódico. Transferir 10 ml de cada una de estas soluciones a un tubo de ensayo y añadir 10 ml del reactivo colorimétrico y proceder a su valoración colorimétrica a 520 nm, llevando absorbancias frente a concentraciones expresadas en ppm de nitrito sódico.

Informe y resultados.

Calcular el contenido en nitritos de la muestra expresado en ppm por medio de la fórmula:

$$\text{ppm NaNO}_2 = C \cdot 2500 / m \times V \quad \text{siendo}$$

m= peso de la muestra de la que se ha obtenido el extracto (g).

V= volumen, en ml tomado del extracto decolorado

C= concentración en nitrito sódico expresada en ppm determinada sobre la curva patrón.

Tomar como resultado la media de los valores obtenidos en dos determinaciones paralelas.

Cuestiones:

- 1.- ¿Qué función cumplen los reactivos de Carrez?
- 2.- ¿Qué tipo de reacción se produce en el desarrollo del compuesto coloreado?
- 3.- ¿Qué es la concentración eficaz de nitritos?
- 4.- ¿Como actúan los nitritos en la conservación de carnes?
- 5.- Informar si se cumple o no la normativa vigente sobre este aditivo. Ensayar algún producto que NO lleve declarado en la etiqueta este aditivo, (“producto artesano o natural”).

VALORES A CONSIDERAR COMO REFERENCIA EN EL PRODUCTO FINAL.

Parámetro	Crudos curados	Productos esterilizados	Cocidos
Sal	3,5%	-	1,6-2,2%
Almidón	-	-	2,5-8%*
Nitrito sódico o potásico***	150 ppm* 50 a 175 ppm**	100 ppm*	150 ppm*
Nitrato sódico o potásico	150 ppm*	-	Se admiten niveles residuales según producto
Fosfatos	8000 ppm		7500 ppm

*En el momento de la fabricación.

** Contenido residual que varía en función del producto.

***Solo puede utilizarse como aditivo dentro de una mezcla de sal.

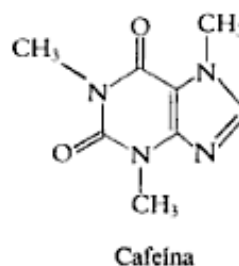
PRACTICA V-UV 05. Extracción, purificación e identificación por espectroscopía ultravioleta de la cafeína obtenida de materias vegetales.

Introducción y justificación teórica.

La **cafeína**, también conocida como *metilteobromina*, *trimetilxantina* o *1,3,7-trimetilxantina* es un alcaloide del grupo de las xantinas, concretamente pertenece a la familia de las metilxantinas. Las bases xánticas o púricas son alcaloides derivados de la purina. Concretamente, provienen del anillo de la purina que se forma a través de la condensación de una pirimidina con un imidazol. Las más importantes son las metilxantinas: cafeína, teofilina y teobromina, conocidas respectivamente como 1,3,7-trimetilxantina, 1,3-dimetilxantina y 3,7-dimetilxantina.



Planta del café o cafetos.



Estructura molecular de la cafeína

Este alcaloide está presente en los granos y hojas de la planta del café, las hojas de té, los granos de cacao, la nuez de cola, la hierba mate y las bayas de guaraná. Antes de que se identificara esta sustancia como componente común a todas estas plantas se pensaba que eran sustancias diferentes, a las que se dio el nombre de *teina*, *mateina* y *guaranina*.

Resumiendo, la cafeína se encuentra tanto en el café como en el té y en el cacao. La teofilina se encuentra solo de forma residual en el café y en el té y la teobromina se encuentra como alcaloide primario en el cacao y en baja proporción en el té.

Algunos de los alcaloides más conocidos son quinina, cafeína, morfina, estricnina y atropina. En la siguiente tabla se ve la composición de los tipos de café más habituales:

%	<i>arábica</i>	<i>robusta</i>
Cafeína	1,1 -1,5	1,9 - 3,5
Trigonelina	0,9 - 1,3	0,6 - 0,8
Acido clorogénico	7,0 - 11,0	11,0 - 15,0
Sacarosa	6,0 - 8,0	3,0 - 4,0
Materia grasa	13,0 - 16,0	7,0 - 11,0

La fórmula química de la cafeína es $C_8H_{10}N_4O_2$, con una masa molecular de **194,19 g/mol**. Es una molécula química aquiral, y por lo tanto, no tiene enantiómeros ni tiene estereoisómeros.

En estado puro es un sólido cristalino blanco inodoro en forma de agujas blancas o polvo, con un gusto muy amargo, que tiene una densidad de 1,23 g/ml, un punto de fusión de 237 °C y es eflorescente en contacto con aire. A presión atmosférica sublima a 176 °C, sin descomposición. También, puede cristalizar en forma de prismas hexagonales.

Esta sustancia es soluble en agua y es función directa de la temperatura. A 25 °C se disuelven 22 mg de cafeína en 1 ml de agua, mientras que a 80 °C se diluyen 180 mg/ml y a 100 °C lo hacen 670 mg/ml. Es muy soluble en agua hirviendo en la que cristaliza como monohidrato, ya que va perdiendo progresivamente la molécula de agua, hasta que lo hace totalmente a los 100 °C.

Sin embargo tiene más afinidad por algunos disolventes orgánicos, como el cloroformo ($CHCl_3$) y el diclorometano (CH_2Cl_2), que a su vez son casi inmiscibles en agua.

La cafeína es el estimulante leve psicoactivo más consumido en el mundo y se encuentra en bebidas no alcohólicas como el café, el té y el mate.

El café es un estimulante del sistema nervioso central por su elevado contenido en cafeína. Las preparaciones con las semillas de café se utilizan como remedio habitual para estimular el organismo. De esta manera, se usa para mantenerse despierto evitando la somnolencia, para estimular la mente y aumentar la energía del organismo. Aunque más débil que otros estimulantes, la cafeína puede producir síntomas de intoxicación, tolerancia y abstinencia causados por esta sustancia en algunos individuos.

Tiene efecto diurético y estimulante del miocardio. Relaja los músculos lisos, favorece la vasodilatación, contrae las arterias cerebrales, aumenta la secreción ácida del estómago y potencia la contracción del músculo esquelético.

Pero en grandes dosis pueden elevar el humor, causar insomnio, aumentar la irritabilidad, inducir ansiedad y disminuir el cansancio. La ingesta crónica o intensa, causa intoxicación que se manifiesta con nerviosismo, insomnio, hiperacidez gástrica, contracciones musculares, confusión, taquicardia o arritmia cardíaca y agitación psicomotriz.

Fundamento y objetivo.

La determinación de cafeína ha adquirido mucha importancia, debido a su uso en la industria farmacéutica y en la industria de alimentos; ya sea como ingrediente en la elaboración de refrescos y bebidas energéticas o por su presencia en productos como el té, el mate, el cacao y el café. En todos estos casos, el control de calidad del parámetro cafeína es necesario en los productos que la contienen. Por esta razón, se han desarrollado nuevos métodos instrumentales para su determinación en diversas matrices, especialmente en alimentos.

El café contiene entre un 1% y un 2% de cafeína. El té negro contiene algo más. El método de extracción se basa en la distinta solubilidad de los diferentes componentes del café con respecto a la cafeína. Así son poco solubles en agua las proteínas, la celulosa, ésteres de glicerina y ácidos carboxílicos, mientras que son bastante solubles en agua caliente la cafeína, los taninos, glucosa y el ácido clorogénico.

Los taninos y el ácido clorogénico precipitan en presencia de acetato de plomo. Finalmente la cafeína es soluble en cloroformo (triclorometano) y la glucosa no.

En esta práctica se aislará la cafeína bien del café, té, mate, etc., se purificará, bien por disolución o sublimación. Se realizará su espectro UV asignando bandas y elucidando su estructura molecular. Se pesará y calculará el porcentaje respecto a muestra tomada.

Equipamiento y reactivos.

Espectrofotómetro visible - UV.

Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Matraz destilación 500 ml

Refrigerante de bolas o similar.

Sistema de filtración a vacío y embudo Büchner grande.

Embudo de decantación 250 ml.

Rotavapor

Cristalizador y material fungible general.

Solución de acetato de plomo 10% (w/v).

Cloroformo (triclorometano)

Tolueno.

Éter de petróleo.

Diclorometano.

Hidróxido sódico.

Sulfato de magnesio (sulfato de sodio anhidro ó cloruro de calcio anhidro).

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

1.- Extracción de cafeína a partir de café.

En un matraz de destilación de 500 ml depositar 25 g de café molido, unos trozos de plato poroso o piedra pómez y 100 ml de agua destilada o desionizada, conectar un refrigerante de bolas y calentar suavemente a reflujo durante 20 minutos aproximadamente.

Con la disolución en caliente filtrar a vacío empleando un embudo Büchner de tamaño grande. Desechar el residuo sólido, pasar el filtrado a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y añadir 25 ml de disolución acuosa al 10% (w/v) de acetato de plomo. Calentar y agitar durante unos 15 minutos para que precipiten los correspondientes acetatos.

Filtrar de nuevo a vacío y en caliente, una vez enfriado el líquido filtrado pasarlo a un embudo de decantación de 250 ml.

Se realiza una primera extracción con 25 ml de cloroformo, **sin agitar bruscamente** (porque puede formarse una emulsión que tardaría mucho en destruirse), pero si suavemente. Dejar reposar hasta que se separen las dos fases y recoger la inferior en un Erlenmeyer de 100 ml que se tapa. Repetir la operación de extracción de igual manera y juntar las dos disoluciones de cloroformo, se desecha la fase acuosa.

Introducir de nuevo la fracción clorofórmica en un embudo de decantación y añadir 20 ml de disolución acuosa de NaOH al 5 %, agitar suavemente y retirar de nuevo la fase clorofórmica. Realizar luego un lavado en el embudo de decantación con 10 ml de agua destilada. Se obtendrá finalmente una disolución de cloroformo en cafeína, a menudo de aspecto turbio.

Para desecar la disolución clorofórmica, añadir una pequeña porción de sulfato de sodio anhidro o cloruro de calcio anhidro y agitar hasta que se observe total transparencia. Eliminar el desecante por filtración a través de un filtro de pliegues, poner en Erlenmeyer de 100 ml y tapar. Evaporar el cloroformo en rotavapor, pesar y guardar el residuo de cafeína bruta. Preparar una disolución acuosa en las concentraciones indicadas en el espectro adjunto y realizar un registro en la zona ultravioleta frente a un blanco de agua y con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Para purificar por recristalización tomar una parte de la cafeína obtenida y disolver en la menor cantidad posible de tolueno en caliente, filtrar en caliente a través filtro de pliegues. En el filtrado añadir éter de petróleo gota a gota hasta observar turbidez y enfriar, filtra de nuevo y realizar otro espectro de una disolución acuosa de los cristales obtenidos. Comparar los dos espectros.

Si se desea se puede medir el punto de fusión de la cafeína, su valor debe estar comprendido entre 236 °C y 238 °C.

2.- Obtención de la cafeína a partir del té.

Se extraerá la cafeína de las hojas de té (se utilizará un té comercial, por ejemplo té negro o similar), mediante una extracción sólido-líquido en un extractor Soxhlet, posterior extracción líquido-líquido del extracto acuoso obtenido con diclorometano en embudo de decantación. La cafeína se purificará por sublimación.

La pureza de la cafeína antes y después de la purificación se comprobará por espectroscopia molecular ultravioleta.

También se puede comprobar el grado de pureza por la técnica de Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Las técnicas de laboratorio químico que se van a emplear son: calentamiento a reflujo, extracción sólido-líquido, extracción líquido-líquido, empleo de desecantes químicos, filtración en Büchner a vacío, empleo de rotavapor para eliminación de disolventes, cromatografía en capa fina o análisis espectroscópico en el UV, sublimación, etc.

El procedimiento experimental sería el siguiente. En un matraz de fondo redondo de 500 ml se introducen 12 g de té seco, 250 ml de agua destilada o desionizada y unos trocitos de plato poroso, la mezcla se calienta a reflujo durante 20 minutos (desde que empiezan a condensar los primeros vapores. Al cabo de este tiempo se retira la mezcla de la fuente de calor y después de unos minutos y con la mezcla aún caliente, a través de un embudo Büchner aplicando vacío y se vierte el filtrado en un matraz erlenmeyer de 500 ml. Añadir de forma gradual 30 ml de una disolución acuosa de acetato de plomo al 10 % (w/v), calentar y agitar durante al menos 30 minutos y dejar reposar la mezcla hasta que alcance la temperatura ambiente. Filtrar de nuevo en embudo Büchner de tamaño grande aplicando vacío. Concentrar la disolución obtenida hasta un volumen aproximado de 25- 30 ml. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente. La extracción se puede realizar con compuestos organoclorados, bien con tres fracciones de 20 ml de cloroformo (triclorometano) densidad 1,48 g/ml o bien con dos fracciones de 25 ml de diclorometano, densidad 1,33 g/ml, siempre SIN AGITAR BRUSCAMENTE y destapando de vez en cuando el embudo para eliminar sobrepresiones y facilitar la separación nítida de las dos fases.

Juntar todos los extractos y secar añadiendo una pequeña cantidad de sulfato de magnesio anhidro hasta observar total transparencia, decantar o filtrar y concentrar a sequedad en rotavapor. Después de pesar el residuo blanco-amarillento que se obtendrá, se reservan unos miligramos para disolver en agua destilada y hacer su espectro UV y el resto se puede purificar bien por sublimación como indica la figura o bien por precipitación con disolvente de distintas solubilidades, se disuelve una porción de cafeína bruta en la menor cantidad posible de cloroformo y esta disolución sobresaturada se precipita con éter de petróleo añadido gota a gota y se filtra con la técnica para filtrado de pequeñas cantidades. Se realizará un espectro UV de la cafeína purificada.

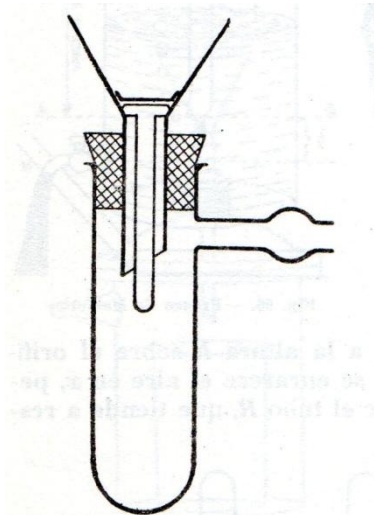
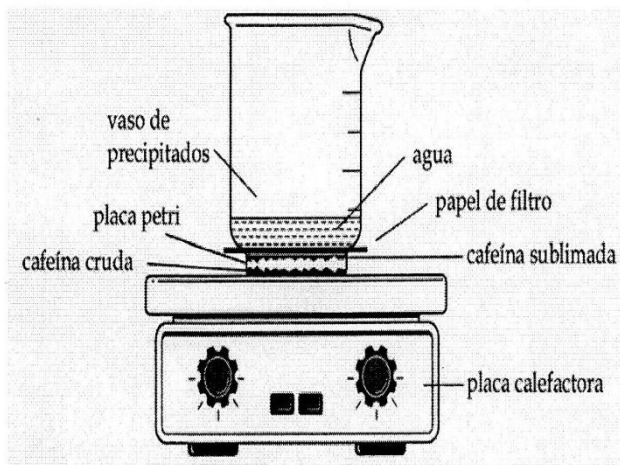
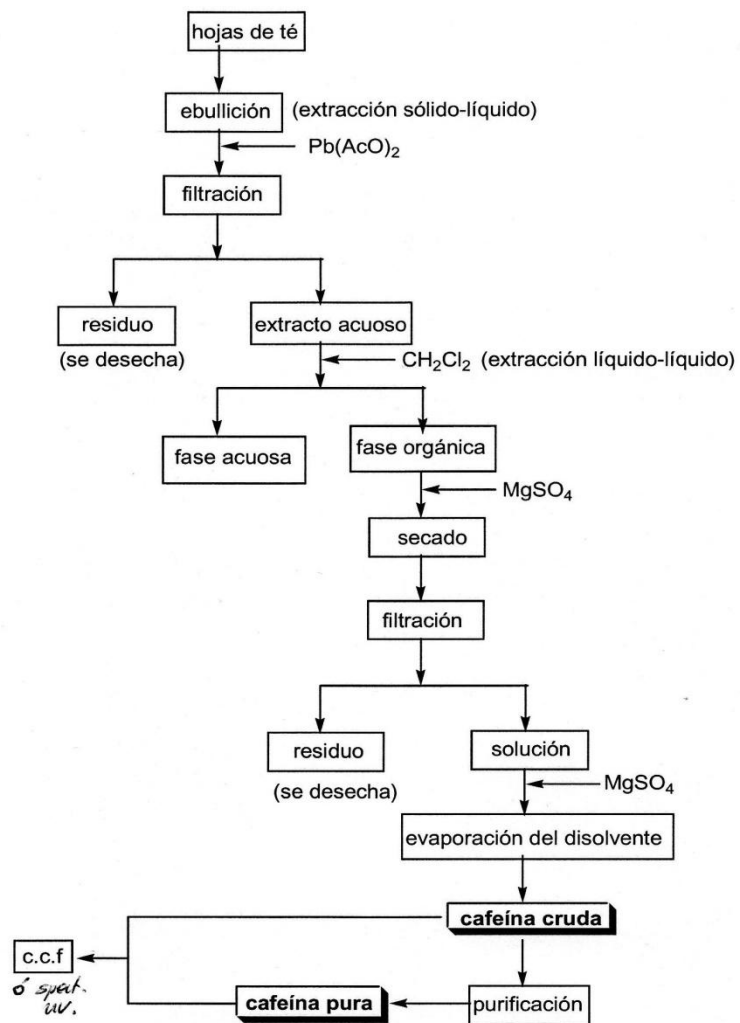


Fig. 98. — Dispositivo para filtrar pequeñas cantidades de sustancia.

Purificación por sublimación de la cafeína.



3.- Obtención de la cafeína a partir del mate.

Dos parámetros característicos de la calidad de la yerba mate son los contenidos de cafeína y extracto acuoso. Los contenidos de cafeína varían entre 0,95 y 1,24 g/ 100 g de sólido seco. Una forma de proceder sería la siguiente.



Pesar 5 g de muestra pulverizada y tamizada en matraz erlenmeyer de 1 litro, agregar 400 ml de agua destilada, mezclar y calentar a ebullición durante 1 hora.

Agregar 10 g de óxido de magnesio, hervir lentamente durante 2 horas con agitación ocasional.

Adicionar agua para prevenir la formación de espuma y lavar las paredes del matraz. Enfriar y filtrar.

Acidular el filtrado con 10 ml de disolución de ácido sulfúrico (1:9) y poner nuevamente a hervir hasta reducir el volumen a un tercio.

Una vez frío, filtrar y extraer en un embudo de decantación con 3 porciones de cloroformo (30, 25 y 20 ml).

Pasar la fase orgánica a otro embudo de decantación.

Extraer la fase clorofórmica con 5 ml de solución de hidróxido de potasio al 1% y pasar la fase orgánica a una cápsula previamente tarada a través de sulfato de sodio anhidro. Lavar la solución alcalina 2 veces con 10 ml de cloroformo y reunir estas porciones en la cápsula.

Evaporar los extractos clorofórmicos en baño de agua hirviendo.

Secar en estufa a 105 °C hasta peso constante.

Cálculo y expresión de resultados.

$$\% \text{ cafeína (base húmeda): } C = (a - b) \times 100 / p$$

donde:

a: peso de la cápsula más residuo, g

b: peso de la cápsula sin residuo, g

p: peso muestra, g

En general la reglamentación se refiere a % de cafeína sobre materia deshidratada.

$$\% \text{ cafeína} = (C \times 100) / (100 - \% \text{ humedad})$$

Informe y resultados.

Identificación de la cafeína y contenido en la materia vegetal de que se trate.

Cuestiones:

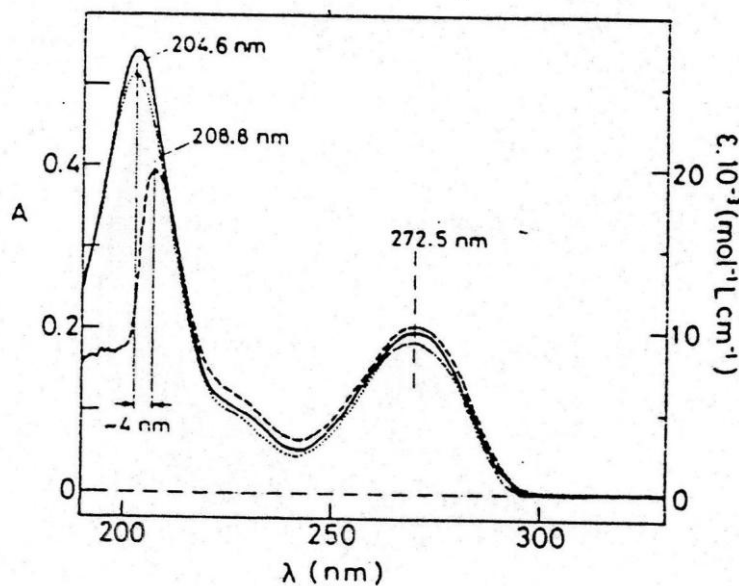
- 1.- ¿Qué función cumple el acetato de plomo?
- 2.- ¿Qué tipo de extracción desarrollamos y cómo podríamos optimizarla?
- 3.- ¿Por qué se añade una disolución de hidróxido sódico al 5%?
- 4.- ¿Qué técnicas utilizamos para purificar la cafeína?

Problema.

La cafeína ($C_8H_{10}O_2N_4 \cdot H_2O$) posee una absorbancia de 0,510 a 272 nm y 1 cm de paso óptico en disoluciones de concentración de 1 mg/ 100 ml. Una muestra de 2,5 g de café soluble se diluye con agua a 500 ml. Se toman 250 ml se añaden 25.0 ml de H_2SO_4 0.1 N y se diluye a 500 ml. Se mide la absorbancia a 272 nm resultando ser 0,415. Calcular los gramos de cafeína por kg de café soluble que tiene nuestra muestra.

Dato: Peso molecular cafeína: 212 g/mol.

Solución: 3,25 g/Kg.



Espectro ultravioleta disolución acuosa de cafeína a pH neutro
Concentraciones $2 \cdot 10^{-4} M$, $2 \cdot 10^{-5} M$

Métodos para obtener café descafeinado.

Lo que de verdad diferencia a los cuatro métodos es la elección de la sustancia que se usa para la extracción:

- **Método de agua.** Cuando el café verde se sumerge en agua se disuelve y se quita el contenido de cafeína, pero junto con eso puede perderse mucho del carácter aromático del café. Para superar ese inconveniente, se satura el líquido con los componentes solubles en agua del café. A continuación se quita la cafeína de la solución usando carbón activado u otros adsorbentes que conservan la cafeína, y después puede reciclarse el extracto al que se privó de cafeína.
- **Método de acetato de etilo.** El acetato de etilo se da en varios productos naturales y contribuye al aroma característico de muchas frutas. También se encuentra el acetato de etilo, en distintas concentraciones, en productos alimenticios entre los que están el café verde y el tostado. En el proceso de descafeinización se usa una combinación de agua y acetato de etilo. Para extraer la cafeína, en el recipiente de extracción se hace circular el acetato de etilo alrededor de los granos empapados en agua. Después, se vacía del recipiente de extracción la mezcla de acetato de etilo y cafeína. La etapa de extracción se repite varias veces, hasta que el contenido residual de cafeína está al nivel máximo reglamentario de 0,1% o menos.
- **Método de dióxido de carbono supercrítico y dióxido de carbono líquido.** El CO₂ es una sustancia de gran pureza natural que se encuentra en el aire que respiramos y en el agua burbujeante que bebemos. En determinadas condiciones puede hacerse con esa sustancia una extracción selectiva de cafeína que deja sin alterar la mayor parte de los demás constituyentes del grano de café. Para usar el dióxido de carbono en su estado supercrítico (entre su estado líquido y su estado gaseoso) se necesita una presión muy alta 72,8 atm , 304,1^oK y su densidad en estas condiciones es 0,469 g/cm³. Este método exige una producción en gran escala para ser viable desde el punto de vista económico. También puede usarse el CO₂ líquido para la extracción de cafeína con presión y temperaturas más bajas, con lo que se necesita más tiempo para lograr la extracción.
- **Método de cloruro de metileno (bicloruro de metileno-DCM).** El cloruro de metileno extrae la cafeína selectivamente y tiene un punto de ebullición bajo. Para extraer la cafeína, en el recipiente de extracción se pone a circular el bicloruro de metileno alrededor de los granos empapados en agua. Después, la mezcla de cloruro de metileno y cafeína se vacía del recipiente de extracción. Esto se repite varias veces, hasta que el contenido residual de cafeína está al nivel máximo reglamentario de 0,1% o de menos. Este proceso cumple garantías de que los posibles residuos de disolventes se mantengan por debajo de los límites que se fijan en la legislación europea.

Fuente: Centro de Información Científica sobre el Café (CoSIC).

PRÁCTICA V-UV 06. Síntesis de dos colorantes: Anaranjado de β – naftol e índigo. Caracterización por espectroscopía vis-UV. Aplicación en tinción textil. Evaluación de la solidez del color. Medida de coordenadas cromáticas CIE (L^* , a^* , b^*).

Introducción y justificación teórica.

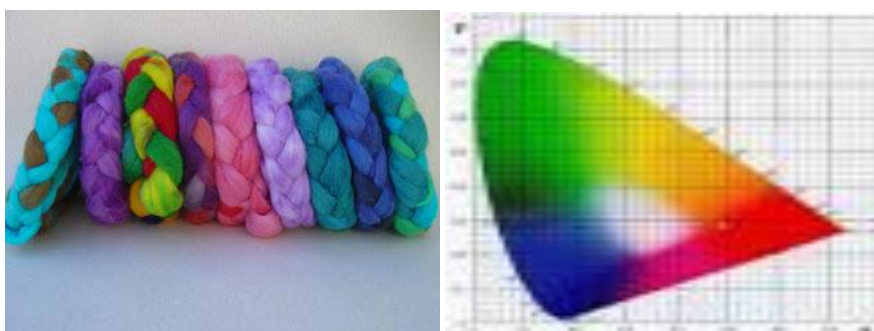
El colorante azoico es un colorante sintético que tiene el grupo $-N=N-$ como grupo cromóforo en su estructura molecular y se obtiene a partir de los compuestos aminados por diazoación y copulación. Más de la mitad de los colorantes del comercio pertenecen a este grupo.

Variando la composición química es posible obtener colorantes ácidos, básicos, directos o con mordiente. Este grupo general se subdivide en monoazo, diazo, triazo, y tetrazo, según sea el número de grupos $-N=N-$ de la molécula.

Ejemplos de esta clase son anaranjado β -naftol o colorante Naranja II, la crisoidina Y, pardo Bismarck 2RR, verde directo B, etc.

Las aminas primarias aromáticas con ácido nitroso forman sales de diazonio relativamente estables, estas pueden actuar como electrófilos débiles y reaccionar con anillos aromáticos activados, produciendo reacciones de sustitución electrofílica aromática.

Los fenoles y las aminas aromáticas poseen un anillo activado que permite que las sales de diazonio reaccionen con ellos; produciendo compuestos coloridos que pueden ser usados como colorantes.



Desde la coloración de vestimentas en el antiguo Egipto hasta la tinción de los pantalones vaqueros o jeans, el índigo ha servido para teñir tejidos de azul durante 3000 años.

Fue uno de los primeros ejemplos de colorante “a la cuba”. Se trata de compuestos insolubles en agua que son reducidos y cuya forma reducida es soluble en agua. La operación se realiza en una cuba donde el índigo se pone a reaccionar con un reductor (en esta práctica ditionito sódico).

Las fibras a teñir se mantienen en la cuba durante un tiempo prolongado y después se suspenden al aire libre. De esta manera, la forma reducida se reoxida y queda sobre la fibra la tintura azul original.

Antiguamente, el índigo se extraía de una planta llamada indigófera. Su estructura fue determinada en 1870 por Baeyer. Asimismo, la síntesis industrial de índigo fue desarrollada en 1890 por Heumann según un procedimiento que se utiliza incluso hoy en día.

Fundamento y objetivos.

Sintetizar dos colorantes de distinta naturaleza para teñir fibras proteínicas y fibras celulósicas. Realizar su espectro visible-UV para caracterizarlo. Teñir fibras naturales y comprobar la solidez del color a diversos agentes externos. Familiarizarnos con la medida de coordenadas cromáticas y evaluación de diferencias de color.

REACCIÓN DE DIAZOACIÓN.

La reacción de diazoación es una de las más importantes en química orgánica y es la combinación de una amina primaria con ácido nitroso para generar una sal de diazonio. El ácido nitroso como tal es gaseoso, pero se pueden preparar soluciones acuosas diluidas, haciendo reaccionar nitritos alcalinos como el nitrito de sodio (NaNO_2) con algún ácido mineral como el ácido clorhídrico acuoso, o el ácido sulfúrico, perclórico o fluorobórico.

Cuando se trata de una amina primaria alifática la sal de diazonio que se genera es muy inestable y regularmente se descompone inmediatamente, por lo que esta reacción no se considera sintéticamente útil. En contraste, cuando se utiliza una amina primaria aromática, la sal que se genera, es relativamente estable en solución y a temperaturas menores de 5 °C, con lo cual, se tiene oportunidad de manipularlas y convertirlas en una variedad de grupos funcionales diferentes, dándole a la reacción una gran aplicación sintética.

REACCIÓN DE COPULACIÓN.

En condiciones apropiadas las sales de diazonio pueden reaccionar como reactivos electrofílicos en sustituciones aromáticas para dar productos llamados compuestos azo. A esta reacción se le conoce como reacción de copulación. Los compuestos azo tienen una gran importancia industrial debido a que son sustancias intensamente coloridas, por lo que una gran variedad de ellas, se utilizan como colorantes artificiales. Las coloraciones pueden ser amarillas, naranjas, rojas, azules e incluso verdes, dependiendo de la estructura del compuesto.

Las sales de diazonio son poco electrofílicas por lo que reaccionan solo con compuestos aromáticos ricos en electrones, en otras palabras, que tengan grupos fuertemente electrodonadores, como $-\text{OH}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NHR}$ o $-\text{NH}_2$. Por lo común, la sustitución se realiza en la posición para con respecto al grupo activante.

La mecánica de la reacción se inicia con el ataque del enlace π del anillo rico en electrones a la sal de diazonio, la cual por polarización de uno de los enlaces, neutraliza la carga positiva del nitrógeno central, generando de esta manera directamente el compuesto diazo.

Equipamiento y reactivos.

Espectrofotómetro visible-UV.

Cubetas cuarzo 1 cm paso óptico.

Balanza analítica.

Agitador magnético.

Espectrocolorímetro o colorímetro triestimulos.

Equipo para ensayos de solidez color al lavado en textiles.

Escalas de grises para valorar degradación y descarga.

Material de vidrio general de laboratorio.

Embudo Büchner, papel de filtro, bomba de vacío, etc.

Muestras tejido blanco lana, seda, algodón, lino, etc.

Mordientes: sal común, ácido acético, taninos, etc.

Hielo.

Ácido sulfanílico PS, β -naftol, nitrito sódico, HCl 4N, NaOH al 10%, cloruro sódico, sulfato sódico y ácido acético glacial.

2-Nitrobenzaldehido, acetona, NaOH 2N, ditionito sódico ó hidrosulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), peróxido de hidrógeno, perborato sódico, etanol y agua desionizada.

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **cantidad** de reactivo que vamos a necesitar, si son necesarios todos o hay alguno alternativo, a la **calidad** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **riesgos para la salud y precauciones** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**. Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Procedimiento operativo.

Síntesis del anaranjado de β – Naftol.

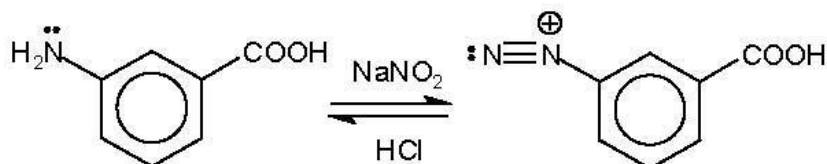
Diazotación.

Cuando las aminas primarias aromáticas son tratadas con ácido nitroso, se forman sales de diazonio; ésta reacción puede llevarse a cabo, también, con aminas alifáticas, sin embargo, debido a que las primarias aromáticas son más estables químicamente, es que se prefiere trabajar con ellas.

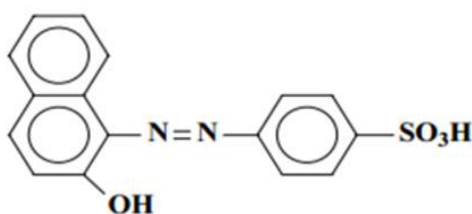


Las sales aromáticas de diazonio son estables a bajas temperaturas (5° – 10°C). Estas sales se preparan en medio acuoso y se usan sin ser aisladas.

A pesar de que la diazotación se lleva a cabo en medio ácido, la especie realmente atacada no es la sal de la amina (anilinio), sino la pequeña cantidad de amina libre presente sin protonar. Las aminas alifáticas son bases más fuertes que las aromáticas y cuando el pH es inferior a 3, no hay suficiente amina alifática libre presente para ser diazotada, mientras que la aromática es capaz de seguir con la reacción.



Reacción de copulación

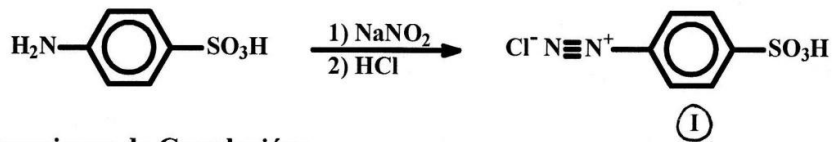


Estructura química del colorante naranja II

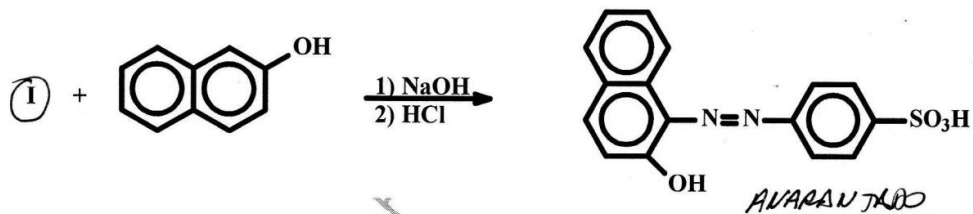
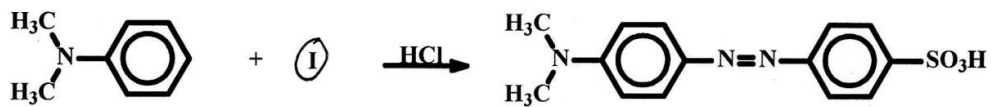
Propiedades

- El naranja II es un colorante azoico de fórmula química $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$
- Peso molecular 350,32 g/ mol
- Estado físico: polvo amarillo
- Punto de fusión: 164 °C
- Solubilidad: soluble en agua

Diazoación:



Reacciones de Copulación:



Desarrollo.

Antes de comenzar, será necesario leer cuidadosamente los pasos a seguir, así como considerar los tiempos de reacción de cada mezcla, pues de acuerdo a estos tiempos ser irán integrando unas mezclas con otras.

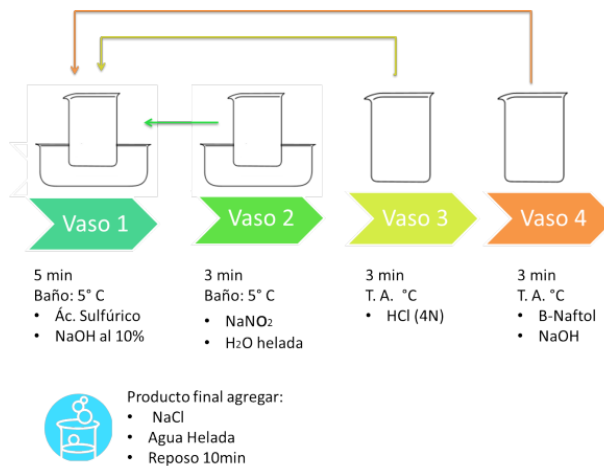


Diagrama de proceso para obtención del colorante naranja II

1. **Vaso N° 1:** colocar el vaso en un baño entre 0 y 5 °C; agregar 1 g de ácido sulfanílico y adicionar por goteo aproximadamente 2 ml de NaOH al 10%, agite constantemente, durante la adición de la sosa y durante los 5 min que deberá permanecer nuestra mezcla en el baño de agua helada.
2. **Vaso N° 2:** colocar el vaso en un baño entre 0 y 5 °C; agregar 0,4 g de NaNO₂ y adicionar por goteo y con agitación constante, 2 mL de agua helada. Agitar constantemente durante 3 min, mientras permanece en el baño de agua helada. Pasados los 3 min y los 5 min del primer vaso, agregar el vaso N° 2 al vaso N° 1. (Éste proceso deberá realizarse casi a la par con el vaso N°1 para evitar dejar en reposo las sustancias más tiempo del indicado).
3. **Vaso N° 3:** transcurridos los 3 min de haber adicionado el vaso N° 2 al vaso N°1, se agrega **a temperatura ambiente**; 5 ml de HCl (solución 4N) al vaso No. 1, agitar constantemente durante 3 minutos.
4. **Vaso N° 4:** pesar 0,8 g de β-Naftol y adicionar por goteo 10mL de NaOH al 10% **a temperatura ambiente**, agitar constantemente hasta lograr una mezcla homogénea, y adicionar al vaso N° 1.
5. Por último agregue al vaso N° 1; 2 g de NaCl y 2mL de agua helada, agite y deje reposar durante 10 min.
6. Filtrar el colorante a vacío mediante embudo Büchner y lavarlo con 2 ml de agua helada. Dejarlo secar al aire sobre papel de filtro y vidrio de reloj.
7. Preparar una disolución del colorante aprox. $1 \cdot 10^{-3}$ M en agua destilada y realizar su espectro vis-UV, asignar bandas y comparar con espectro patrón.

Para efectuar el proceso de tinción se cortan muestras de tejido de lana, seda, algodón, lino, etc. de dimensiones aproximadas 150 x 60 mm.

Previamente con objeto de eliminar aprestos tratamos las muestras con 200 ml de mezcla agua- etanol 1:1 a 50 °C durante 10 minutos.

Teñir a continuación en un recipiente que contenga 100 ml de agua a 50°C en la que se hayan disuelto 0,5 g de anaranjado de β – naftol, 0,8 g de sulfato de sodio y 0,5 ml de ácido acético glacial.

Una vez que hayan sido introducidas las muestras, elevar la temperatura del baño de tinción durante 10 minutos hasta alcanzar la temperatura de ebullición, luego dejar a ebullición las muestras otros 10 minutos. Durante el proceso de tinción remover las muestras,

Finalmente escurrir, enjuagar con agua para eliminar colorante no adherido y dejar secar al aire o en estufa a 60°C.

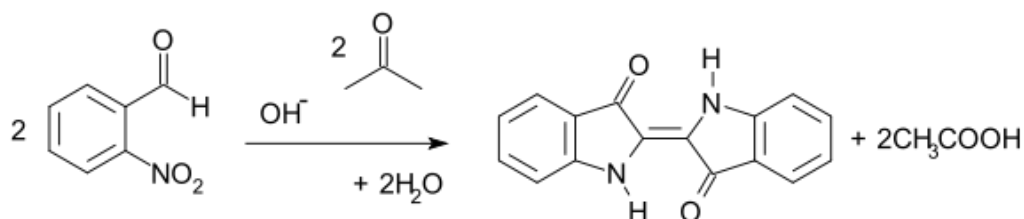
Medir coordenadas cromáticas y comprobar la solidez del color aplicando alguna de las siguientes normas:

Solidez al lavado en <i>Linitest</i>	Solidez del color al lavado doméstico y comercial	UNE-EN ISO105-C06:2010
Solidez a la limpieza en seco en <i>Linitest</i>	Solidez al lavado con percloroetileno	UNE-EN ISO105-D01:2010 UNE-EN ISO3175
Cálculo de diferencias de color	Valoración alteraciones color antes y después ensayo	UNE-EN ISO 105-J03:2010

SINTESIS DEL ÍNDIGO.

La síntesis del índigo de Baeyer-Drewson (1882) es una reacción orgánica en la cual se prepara el índigo a partir de o-nitrobenzaldehído y acetona.

Proceso de síntesis del índigo:



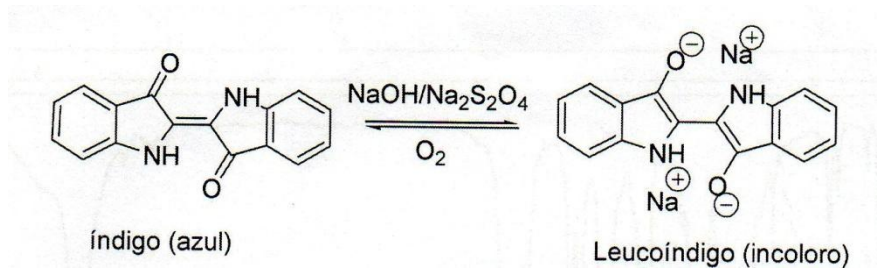
La reacción es una condensación aldólica. Como una ruta práctica para obtener índigo ha desplazado la de la anilina.

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se disuelven 2 g de 2-nitrobenzaldehido en 40 ml de acetona y después se diluye con 70 ml de agua desionizada o destilada.

La disolución resultante se agita vigorosamente con un agitador magnético y se añaden LENTAMENTE 10 ml de NaOH 2N. La disolución se pone amarillo claro y después se oscurece, en menos de un minuto comienza a aparecer un precipitado azul oscuro de índigo. Se prosigue la agitación 5 minutos más, se filtra a vacío en Büchner y se lava con agua hasta que salga incolora y después con 40 ml de etanol.

Se seca el precipitado en estufa durante 15 minutos a 100°C. Se pesa el sólido y se calcula el rendimiento.

Para efectuar el proceso de tinción se ponen en un matraz erlenmeyer de 100 ml unos 200 mg de índigo, añadir 2 ml de etanol y mezclar con espátula hasta obtener una pasta. Añadir 3 ml de NaOH 2N.



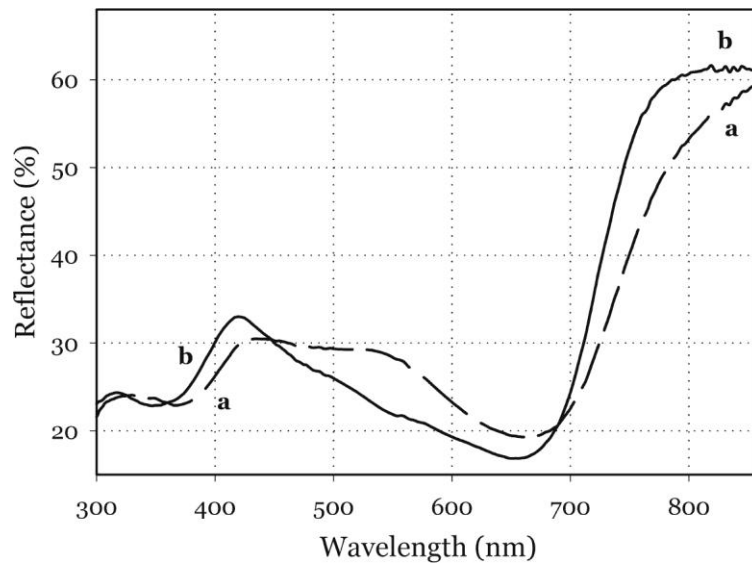
Seguidamente añadir una disolución de 0.6 g de ditionito sódico en 20 ml de agua. Tapar el erlenmeyer con un vidrio de reloj, añadir plato poroso y calentar en placa calefactora a 50 °C (NO AGITAR).

Cuando la disolución esté amarilla (puede que quede algo de índigo sin reducir en la superficie) introducir la pieza de algodón a teñir y dejar durante 30 minutos a 50 °C.

Tras ello se retira la muestra de algodón y se lava con agua, para arrastrar las partículas de índigo que hayan quedado en la superficie sin adherirse. Se deja secar al aire durante 30 minutos para el desarrollo del color. El “revelado puede acelerarse mediante tratamiento de la fibra con agua oxigenada o perborato sódico.

Informe y resultados.

Calcular rendimiento de la síntesis de los colorantes y adjuntar espectros vis-UV obtenidos.



Curva b espectro del índigo.

Cuestiones:

1. ¿Cuál es la razón por la cual las sales de diazonio aromáticas son relativamente estables?
2. ¿Cómo evita que se descompongan las sales de diazonio?
3. Compare los dos métodos de obtención de los dos colorantes preparados e identifique sus diferencias.
4. ¿Qué pH se requiere en la mezcla de reacción para que la copulación de las sales de diazonio sea óptima con aminas y fenoles?
5. ¿Qué es un colorante y como proporciona color a la tela?
- 6.- ¿Por qué crees que el índigo es un producto tan intensamente coloreado?
- 7.- En el proceso de tinción ¿por qué es necesario finalmente “revelar” la muestra textil?
- 8.- Señalar las principales bandas de absorción en el espectro vis-UV de los dos colorantes obtenidos.

Referencias.

- 1.- <https://quimicadelcolor.wordpress.com>
- 2.- <http://organica1.org/1405/anaranjado.pdf>
- 3.- http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ojuanes/poster_indigo.pdf
- 4.- <http://132.248.103.112/organica/lab3/manual3.pdf>
- 5.- Prácticas de Química Orgánica. ETS Ingenieros Industriales, UPM.

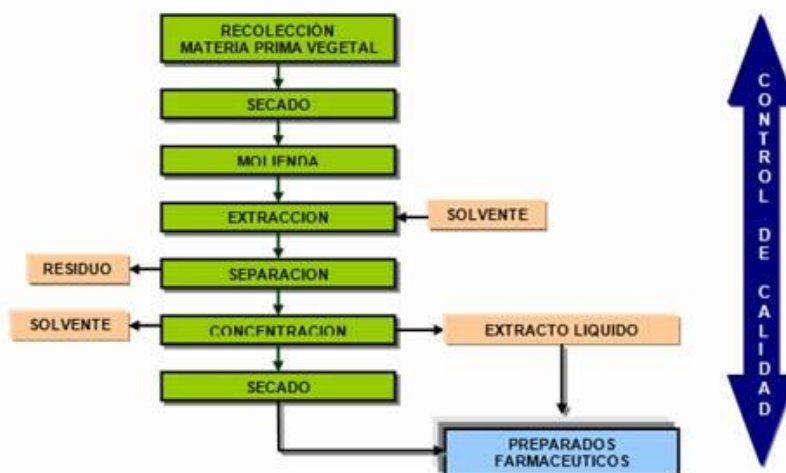
PRÁCTICA V-UV + FTIR 07. Aceite de almendras dulces: extracción, caracterización por diversas técnicas y utilización en cosmética.

Introducción.

El objetivo es proponer un experimento de química orgánica que involucre la extracción en frío, extracción en caliente, extracción multietapa en Soxhlet del aceite de almendras a partir de almendras dulces, utilizadas comúnmente en alimentación; analizar las diferencias observadas según las temperaturas de extracción del mismo y los métodos empleados; caracterizarlo por refractometría, espectroscopía UV y espectroscopía infrarroja FTIR. Se podrá utilizar en preparaciones cosméticas, teniendo en cuenta sus propiedades.

Es importante destacar que si bien los métodos de extracción de los productos naturales requieren largos tiempos y altas temperaturas; en la actualidad se dispone de tecnologías más efectivas y avanzadas como extracción con fluidos supercríticos, microondas, ultrasonidos que facilitan la tarea. Esta experiencia es muy interesante para el alumno que cursa Química Orgánica Experimental dentro de la Ingeniería Química, ya que logra integrar sus conocimientos básicos al mismo tiempo que despierta su interés científico e industrial (introducción a la obtención de productos comerciales).

Esquemáticamente el diagrama de flujo sería de la forma:



Generalidades de la almendra.

La almendra pertenece a la familia de las rosáceas y es del género *Prunus*, constituye una de las fuentes de alimentación más antiguas del mundo. Su origen proviene de Asia central y su cultivo prosperó principalmente en España e Italia donde la planta encontró las condiciones ideales para su crecimiento. Posteriormente, los jesuitas españoles la llevaron a California, donde se encuentra el mayor centro de producción mundial.

Además de ser apreciada por su sabor, por su valor nutritivo y por sus extendidos usos medicinales y cosmetológicos, la almendra también está asociada a la buena fortuna. En la antigüedad, en las bodas, los novios regalaban a los invitados cinco almendras dulces como símbolo de salud, fertilidad, suerte, riqueza y felicidad. Al contrario de las dulces, las almendras amargas fueron asociadas a la desgracia y a la muerte, razón por la cual, muchos autores literarios las han incluido en sus textos. Gabriel García Márquez en *El amor en los tiempos del cólera* menciona: "*Era inevitable: el olor de las almendras amargas le recordaba el destino de los amores contrariados...*".

La semilla (parte comestible del almendro) es alargada, tirando a ebúrnea, recubierta de una piel marrón y fibrosa. Es relativamente crujiente, de sabor muy suave, nada ácida, oleosa, poco aromática cuando está cruda, pero con un aroma y un sabor mucho más intensos cuando se tuesta.



Las almendras que solemos utilizar en las comidas poseen sabor agradable y provienen del almendro dulce (*Prunus amygdalus* var. *Dulces*) siendo ésta la variedad que se cultiva extensamente. Los beneficios de las almendras para la salud de las personas son múltiples, ya que contienen: agua, proteínas, grasas, hidratos de carbono, los ocho aminoácidos esenciales y celulosa; vitaminas B₁, B₂, B₃ (niacina, ácido nicotínico o vitamina PP), C, A, D y E; calcio, fósforo, hierro, potasio, sodio, magnesio, azufre, cloro, manganeso, cobre y zinc; constituyendo un alimento imprescindible en una dieta sana y equilibrada. Es una de las fuentes vegetales más ricas en calcio, de allí que la leche de almendras se emplee como sustituta de la leche de vaca cuando ésta no se tolera. Dado su alto contenido en fibras se utiliza como laxante y antiinflamatorio del aparato digestivo y urinario. Además, la almendra, es uno de los frutos secos con mayor cantidad de vitamina E por lo que ejerce un valioso papel antioxidante. Posee un 52% de grasas, de las cuales las dos terceras partes corresponden al ácido oleico, por lo cual, comer almendras es muy parecido a tomar aceite de oliva desde el punto de vista cardiovascular. Tanto es así, que se ha demostrado que en comunidades en que se consumen dosis altas de frutos secos, la incidencia de enfermedades cardiovasculares es menor. Otro punto a tener en cuenta es su contenido en ácido linoleico (omega-6), ácido graso esencial para el organismo que éste no sintetiza y que le es necesario obtener de la dieta. Existe otra variedad de almendras, llamada *Prunus amygdalus* var. *amara*, que es la que produce almendras amargas; éstas son tóxicas para el organismo, por lo que **no se deben consumir**.

A diferencia de las dulces, poseen en su interior una sustancia llamada amigdalina (Laetril o vitamina B-17). Cuando masticamos una de estas almendras ponemos en contacto dicha sustancia con la saliva y la emulsina; esta última es una enzima β -glucosidasa que actúa fraccionando la amigdalina en β -D-glucosa (hidrato de carbono), **benzaldehido** (responsable del sabor amargo y del olor característico) y ácido cianhídrico (HCN).

Gracias al sabor desagradable del aldehido, no ingerimos el ácido cianhídrico, el cual es el responsable del envenenamiento, siendo la dosis mortal de unas 20 almendras para los adultos y 10 para los niños.

En la figura siguiente se esquematizan las rupturas que se producen en la molécula de amigdalina por acción de la emulsina y la saliva al ingerir almendras amargas.

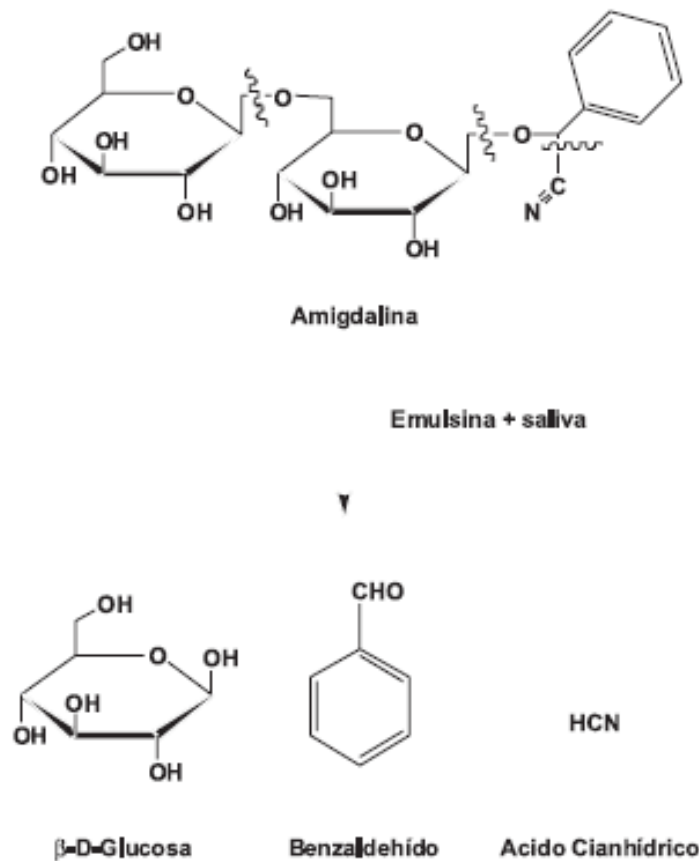



Figura 1. Acción de la emulsina y la saliva sobre la amigdalina presente en las almendras amargas. El símbolo  indica los sitios de las rupturas que se producen en la molécula

Propiedades y usos del aceite de almendras dulces.

El aceite de almendras dulces es uno de los más neutros que existen y no se le conocen contraindicaciones. Contiene agua, proteínas, grasas (sobre todo insaturadas), alto contenido de fibras, vitaminas B, C, A, D y E, hierro, potasio, sodio, magnesio, azufre, cobre, zinc y calcio.

Estas características hicieron del aceite de almendras dulces una medicina natural. Ya en el siglo XV se utilizaba en forma externa para enfermedades de la piel y reuma. Por ser rico en vitaminas y ácidos grasos, tiene un efecto regenerador e hidratante. Debido a la riqueza de proteínas de origen vegetal, cumple con una importante acción nutritiva, motivo por el cual se utiliza en lociones y cremas para ayudar a mantener la flexibilidad de la piel, humectándola, nutriéndola profundamente y previniendo así el envejecimiento prematuro. El aceite de almendras es muy usado para dar masajes, ya que es ligero y su nivel de viscosidad ayuda a que las manos se deslicen, además de los ya mencionados beneficios para la piel, como suavizarla, humectarla y desinflamarla.

Debido a sus propiedades cicatrizantes, el aceite puro de almendras dulces es utilizado especialmente para sacar las costras lácteas que se forman en la cabeza del bebé recién nacido, ya que es un aceite inerte y no tóxico.

Tanto las almendras dulces como las amargas son empleadas en cosmética, aunque la más usada es la dulce, especialmente en extractos puros, aceites y leches desmaquillante de ojos o fortalecedor de pestañas, y también como un tratamiento eficaz para las puntas secas del pelo, ya que nutre, aporta resistencia y volumen.

En general, las almendras amargas, por su toxicidad, se han utilizado únicamente como aromatizantes, aunque en los últimos tiempos se empezó a usar en *peelings* cutáneos, incorporándose también en cremas para el acné, ya que tiene un poder blanqueador y antiinflamatorio. Esto surgió luego del descubrimiento del **ácido mandélico** (ácido alfa-fenilhidroxiacético) al calentar un extracto de almendras amargas diluido en ácido clorhídrico. El nombre de este ácido deriva precisamente de la palabra alemana "*mandel*", que significa "almendra". El ácido mandélico, como alfa-hidroxiácido, posee numerosas aplicaciones en la industria cosmética, siendo de especial interés en el tratamiento de imperfecciones de la piel como el acné o la hiperpigmentación.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos:

Almendras dulces, hexano, agua destilada o desionizada, acetona, glicerina, gelatina sin sabor, manteca de cacao, cera de abeja, aceite de almendras y otros compuestos para cosmética.

Equipamiento:

Molinillo de laboratorio o mortero cerámico.

Estufa desecación.

Agitador magnético con calefacción.

Columnas para reflujo.

Equipo de filtración a vacío.

Manta calefactora

Agitador de varilla.

Extractores Soxhlet.

Material general de laboratorio. La evaporación de solventes para concentrar los extractos obtenidos se realiza en evaporador rotatorio a presión reducida con baño térmico.

Espectrofotómetro FT-IR.

Refractómetro tipo Abbe o similar.

Colorímetro o espectrofotómetro Vis-UV

Dispersador u homogeneizador.

Precauciones en cuanto al trabajo experimental.

Para comenzar a trabajar el alumno deberá estar provisto de gafas de seguridad, bata de laboratorio y guantes. En su caso, se aconseja utilizar mascarilla protectora frente a gases y vapores ó vitrina extractora. Asimismo, se comprometerá a aplicar en todo momento los consejos de seguridad y las Buenas Prácticas de Laboratorio expuestas y conocidas.

Preparación de las almendras.

Se colocan las almendras dulces en un vaso de precipitado, se agregan 100 ml de agua desionizada a 80 °C y se deja en remojo durante 15 min, se secan, se pelan y se muelen finamente. *Importancia de la división y preparación de la muestra para su extracción.*

Extracción del aceite de almendras a temperatura ambiente.

Se pesan 15 g de las almendras molidas y se colocan en un matraz erlenmeyer de 250 ml. Se añaden 20 ml de hexano (solvente de extracción) y se agita la mezcla, con agitador magnético, durante 15 min. Se filtra la mezcla al vacío y se lava el sólido con 10 ml de hexano. Se trasvasa el extracto obtenido a un matraz de destilación de 250 ml, previamente pesado y se destila el solvente por medio de un rotavapor. Por último, se pesa el aceite obtenido y se calcula el rendimiento teniendo en cuenta que la densidad del aceite de almendras es de 0,92 g/cm³ a la temperatura de 20 °C.

Extracción del aceite de almendras a reflujo.

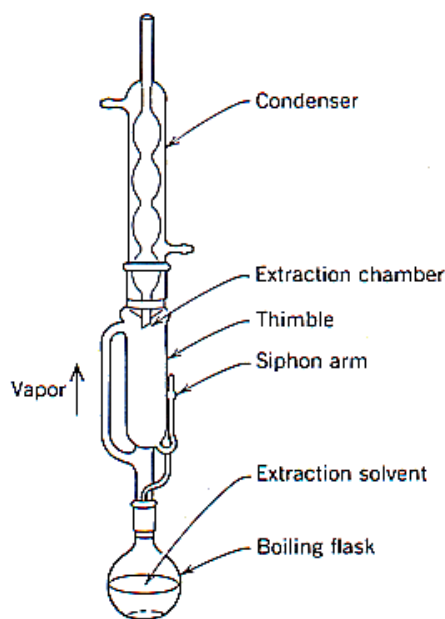
Se introducen 20 ml de hexano dentro de un matraz de destilación de 250 ml, conteniendo 15 g de las almendras molidas. Se conecta un refrigerante de bolas al matraz de extracción y se calienta con manta calefactora, con agitación, hasta llegar a la temperatura de reflujo del disolvente (Pto. ebullición del hexano: 69 °C). Se mantienen estas condiciones por 15 min. Luego, se suspende la agitación y el calentamiento, se deja enfriar la mezcla, se filtran las almendras al vacío y se lavan con 10 ml de hexano. Se trasvasa el extracto obtenido a un matraz de destilación previamente pesado y se destila el solvente por medio de un rotavapor. Por último, se pesa el aceite obtenido y se calcula el rendimiento teniendo en cuenta que la densidad del aceite de almendras es de 0,92 g/cm³ a 20 °C.

NOTA:

Es importante determinar que solvente extractante o mezcla se emplea y en que se fundamenta.

En ambos procedimientos, si se desea obtener un mayor rendimiento de aceite se debe repetir la extracción en las mismas condiciones. También se puede comprobar opcionalmente el rendimiento mediante extracción con **extractor Soxhlet**, haciendo por ejemplo 4 o 5 ciclos extracción.

También es importante hacer notar la importancia de la agitación para favorecer el contacto superficial de la partícula de almendra con solvente no saturado de producto extraído, para favorecer el transporte de masa por difusión.



Extractor Soxhlet

El aceite de almendras obtenido se puede conservar hasta 12 meses a temperatura ambiente.

Dos aspectos muy importantes tanto desde el punto de vista económico como medioambiental que se deben considerar son la completa recuperación del disolvente extractante y el aprovechamiento y valorización del residuo, en este caso de la almendra tras la extracción del compuesto de interés.

Preparación de cremas naturales utilizando el aceite de almendra obtenido.

Las cremas que se desarrollan sólo con ingredientes naturales están ideadas para el cuidado de la piel y su protección. Una crema se compone de determinados elementos que una vez disueltos y mezclados forman una consistencia sólida al llegar al enfriamiento. Suelen durar entre varios días y dos años según la elaboración y sus ingredientes. Las cremas que existen en el mercado poseen conservantes químicos con el fin de prolongar su envasado y ser rentables comercialmente.

Las que vamos a desarrollar son todas 100% naturales y los ingredientes que utilizaremos serán:

Aceite de aguacate, aceite de germen de trigo, aceite de argán, aceite rosa mosqueta, aceite de oliva virgen, etc.

Aceite de almendras dulces: además de las ya mencionadas propiedades, este aceite es idóneo para proporcionarle consistencia cremosa y lubricación a la piel.

Cera de abeja: lubrica y favorece la regeneración de los tejidos. Es una sustancia grasa, blanda hacia los 30-35 °C, que se descompone hacia los 100 °C, lo que obliga a fundirla a una temperatura inferior a la del agua hirviendo.

Manteca de cacao: además de otorgarle la consistencia sólida, es ideal para confeccionar protectores labiales contra el frío o cremas para manos de invierno. Es una cera grumosa, de color amarillo, que se extrae de las semillas tostadas de las plantas de cacao. Se funde a la temperatura corporal y es muy fácil de extender sobre la piel. Este componente posee propiedades emolientes y lubricantes.

Manteca de karité. La manteca de karité, conocida en inglés como *Shea Butter*, es una grasa extraída de la fruta del árbol de karité. Se utiliza como hidratante para la piel y es un aditivo muy popular en productos cosméticos como lociones, jabón, bálsamos para los labios y cremas corporales. La manteca de karité es muy rica en vitaminas A y E, y tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-microbianas. El karité es rico en ácidos grasos esteárico y oleico.

Glicerina: su misión es hacer extensible la crema y darle textura.

Crema suavizante (Opción 1)

Se coloca una parte de manteca de cacao y una parte de la cera de abeja rallada a baño María. Se agrega una parte del aceite de almendras obtenido y se mezcla hasta lograr consistencia homogénea. Se vierte la mezcla, aún caliente, en un recipiente de boca ancha. Se deja enfriar y se etiqueta el envase.

Crema protectora para labios resecos (Opción 2)

Se funde una parte de cera de abeja a baño María. Se añade una parte del aceite de almendras y se homogeniza la mezcla. Se vierte la mezcla, aún caliente, en un molde adecuado. Se deja enfriar y se etiqueta el recipiente.

Crema hidratante para manos (Opción 3)

Una de las causas de que la piel de las manos se reseque es el uso de detergentes que disuelven los componentes hidrófilos segregados por la dermis. Este hecho y la consiguiente pérdida de flexibilidad de la piel pueden prevenirse y aliviarse con cremas que disminuyan la evaporación del agua a través de la piel. En este experimento se fabricará una crema hidratante para las manos a base de gelatina.

Se disuelven 4 g de gelatina sin sabor en agua caliente (80 °C) dentro de un vaso de precipitado a baño María. Se agregan lentamente 25 mL de glicerina y se agita continuamente con varilla de vidrio. Por último, se añaden 3 mL del aceite de almendras obtenido. Si desea proporcionarle color a la crema se debe utilizar unas gotas de colorante vegetal (p.e. curcumina, clorofila, carotenoide, etc.)

Finalmente, se filtra la mezcla en caliente por medio de un embudo provisto de un algodón, se coloca en un frasco de vidrio de boca ancha y se deja enfriar. Se rotula la crema obtenida.

Se hace necesario aclarar que la crema obtenida en esta experiencia no ofrece el aspecto de las cremas hidratantes habituales, ya que se genera un gel coloidal. Si se desea obtener una crema más fluida, simplemente se debe reducir la cantidad de gelatina a utilizar. Queda abierta la posibilidad de que el alumno realice una crema formulada y razonada por él.

Receta crema facial multicomponente (Opción 4)

Mezclar manualmente a temperatura de 30°C: 20 g de aceite de almendras, 20 gramos de aceite de germen de trigo, 20 g de aceite de aguacate, 2 g de ácido hialurónico (se pueden variar las cantidades e introducir otros aceites). Derretir 15 g de manteca de cacao y manteca de karite (solo 5 g de manteca de cacao) y 7 g de cera de abeja incorporar a la mezcla en caliente, por otra parte disolver 2 g de bórax (opcional como conservante, tetraborato de sodio decahidrato) en 60 g de agua mineral. Mezclar todo con ayuda de dispersador (tipo *ultraturrax* o similar) o emulsionador, envasar y enfriar. También se pueden emplear otros aceites como el aceite rosa mosqueta, el aceite de argán, aceite de aguacate, el aceite de almendras, el aceite de oliva virgen, etc. También se puede añadir algún extracto esencial de rosas, lavanda, jazmín, etc. o aceite de caléndula, combate las arrugas y envejecimiento piel.

Introducción a las emulsiones:

En la actualidad, existen dentro del mercado diferentes tipos de emulsiones, dependiendo de las características de sus componentes y de las diferentes necesidades.

Emulsiones (O/W). *Oil - Water*: aceite en agua.

En este tipo de combinaciones las gotitas de aceite se encuentran dentro de la fase acuosa generando un compuesto que se extiende con facilidad y se absorbe de forma rápida sin dejar brillos. Se trata de una composición ligera, de efecto refrescante, que no es en general oclusiva pues no taponan los poros. Este tipo de emulsión está indicada en casos de pieles normales.

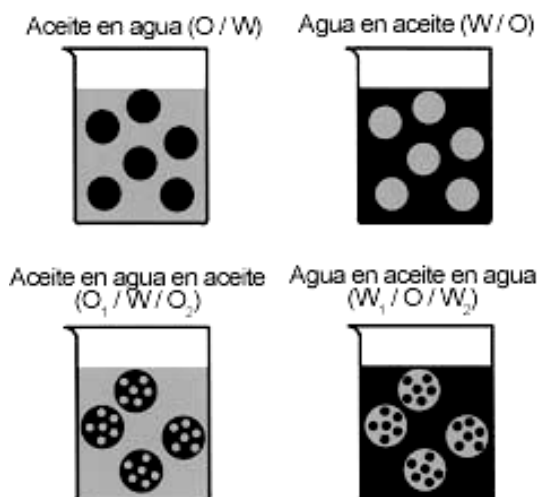
Emulsiones (W/O). *Water - Oil*: agua en aceite.

En este caso se trata de gotitas de agua rodeadas por una fase oleosa. Este tipo de emulsión no se absorbe con facilidad y forma una película protectora que puede taponar los poros. Esta combinación está indicada para pieles más secas que la anterior.

Emulsiones (W/O impermeable).

Este tipo de emulsión es de agua en aceite producida mediante una tecnología determinada y utilizando un aceite especial. Este tipo de preparado se utiliza en productos para la protección solar y evita que los principios activos- filtros UV- se eliminen con agua.

Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles, en las cuales un líquido se dispersa en forma de gotas en otro líquido que se denomina fase continua. El tamaño de las gotas de la fase dispersa se encuentra entre unos pocos cientos de nanómetros a algunas decenas de micrómetros. Las emulsiones son termodinámicamente inestables, lo cual significa que tienen una tendencia espontánea a reducir las interfases (como resultado de una elevada tensión interfacial) lo cual genera que las gotas coalescan, por ésa razón se debe añadir un surfactante para aumentar la estabilidad de la emulsión. El surfactante es una molécula que contiene una parte hidrofílica y otra hidrofóbica (o lipofílica) y que se concentra en la interfase entre los líquidos inmiscibles, donde forman películas interfaciales.



**Tipos de emulsiones simples, aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O). (Parte inferior)
Tipos de emulsiones dobles agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) y aceite en agua en aceite ($O_1/W/O_2$).**

Los dos líquidos inmiscibles que constituyen una emulsión simple típicamente se denominan “aceite” y “agua” y las emulsiones que generan se catalogan como emulsiones aceite en agua (O/W), tales como la leche, en las cuales la materia grasa se encuentra dispersa en una fase continua acuosa, y emulsiones agua en aceite (W/O), tales como la margarina, en las cuales la fase acuosa es la fase dispersa y la oleosa la fase continua.

Tal denominación proviene de las siglas en inglés del aceite (O) y del agua (W). En la figura se muestran las emulsiones simples y dobles (también conocidas como múltiples). Una emulsión doble es una emulsión dentro de otra emulsión; se tienen dos tipos principales de emulsiones dobles: agua-aceite-agua ($W_1/O/W_2$), en la cual una emulsión W_1/O es dispersada en forma de gotas en una fase acuosa (W_2), y emulsiones aceite-agua-aceite ($O_1/W/O_2$), en la que una emulsión O_1/W es dispersada en una fase oleosa (O_2); las emulsiones $W_1/O/W_2$ son más comunes que las emulsiones $O_1/W/O_2$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Observaciones macroscópicas y organolépticas.

A simple vista se puede ver que el color (amarillo pálido), consistencia y untuosidad del aceite de almendras obtenido en ambos casos, se corresponde con el aceite comercial. También es posible medir el color mediante un colorímetro y comprobar esta característica de forma objetiva.

Medida del índice de refracción.

Como control de calidad se puede comprobar el índice de refracción medido con refractómetro tipo Abbe, de cada una de las fracciones de aceite de almendras obtenido y comparar con un aceite de almendras patrón o de calidad contrastada.

Espectroscopía en el ultravioleta.

Obtención del espectro ultravioleta y elucidación de bandas de absorción específicas.

El espectro UV permite el reconocimiento de grupos funcionales y grupos cromóforos (grupos químicos capaces de absorber en UV). Por ejemplo, el limoneno presenta un máximo de absorción en 262 nm.

En general, la espectrofotometría ultravioleta tiene una utilidad limitada en el estudio de la gran mayoría de los aceites esenciales terpénicos, ya que pocos terpenos tienen grupos cromóforos.

Sin embargo, en la fracción no volátil de los aceites esenciales cítricos se encuentran componentes carotenoides o con núcleos heterocíclicos oxigenados (cumarinas, furocumarinas sustituidas y polimetoxiflavonas), lo que da a estas esencias un comportamiento característico en el UV.

Esta particularidad se ha utilizado para la puesta a punto de métodos que permite evaluar la calidad y la genuinidad, identificar el origen geográfico de una muestra, la tecnología empleada para su extracción o la época de producción del aceite.

Análisis espectroscópico FTIR.

La espectroscopía infrarroja es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se emplea con fines cuantitativos. Esta técnica se basa en las distintas absorciones de radiación infrarroja que manifiestan los diferentes grupos funcionales presentes en una molécula. La región infrarroja del espectro incluye la radiación con número de onda comprendidas entre 12.800 cm^{-1} y 10 cm^{-1} lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a $1000\text{ }\mu\text{m}$, divididas en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. De las tres zonas del espectro infrarrojo, la región comprendida entre 4000 a 400 cm^{-1} (de 2.5 a $25\text{ }\mu\text{m}$) es la utilizada en química orgánica para el estudio estructural de las moléculas.

En general, el espectro infrarrojo de un compuesto orgánico proporciona un espectro único, con características que lo distinguen fácilmente del resto de los compuestos, sólo los isómeros ópticos absorben exactamente de la misma forma.

Además de su aplicación como herramienta para el análisis cualitativo, las medidas en el infrarrojo también están encontrando un uso cada vez mayor en el análisis cuantitativo. En este caso, su elevada precisión hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesaria una separación previa.

La **espectroscopia infrarroja** tiene sus bases físicas en la **vibración molecular** la cual se clasifica en **dos categorías básicas**: de tensión o elongación (**stretching**), con cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace y que pueden generar vibraciones simétricas o asimétricas; de flexión (**bending**), cuando cambia el ángulo de enlace de dos átomos. Según sea el movimiento relativo de cada uno de estos átomos, existen cuatro tipos de flexión: simétricas en el plano (balanceo, *rocking*), asimétricas en el plano (tijereteo, *scissoring*), simétricas fuera del plano (aleteo, *wagging*), y asimétricas fuera del plano (torsión, *twisting*).

En cuanto a la representación gráfica de los espectros de infrarrojo, es habitual en estos que la ordenada corresponda a una escala lineal de transmitancia y la abscisa mida linealmente los números de onda en cm^{-1} , siendo posible una variedad de formatos tales como transmitancia frente a longitud de onda y absorbancia frente a número de onda o longitud de onda.

Se utiliza la espectroscopia FT-IR para caracterizar el aceite de almendra obtenido en frío y en caliente y se compara con el aceite de almendras comercial. Los espectros infrarrojo se llevarán a cabo en película líquida y adquiridos entre 4.000 y 400 cm^{-1} con resolución a 4 cm^{-1} . Los resultados presentan una alta reproducibilidad y se observa que es posible detectar la presencia de bandas características correspondientes a ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) y glicéridos.

Estudios de cromatografía líquida (HPLC) realizados en aceites de almendra para exportación revelaron la presencia de la siguiente composición en ácidos grasos: palmítico (C 16:0) 4,0-9,0%, palmitoleico (C 16:1) < 2,0%, esteárico (C 18:0) 0,5-3,0%, oleico (C 18:1) 62,0-86,0% y linoleico (C 18:2) 20,0-30,0%.

En la [Figura 2](#) se indican las bandas características encontradas en el aceite de almendras comercial. En principio se observa una señal correspondiente a la tensión C=CH en 3002 cm^{-1} presentes en los ácidos grasos insaturados de la muestra en estudio. Dos bandas en 2928 y 2854 cm^{-1} asociadas, respectivamente, a la vibración de tensión de C-H simétrico y C-H asimétrico en CH_2 y una banda en 1744 cm^{-1} asociada al movimiento de extensión del enlace C=O típica de los ésteres de triglicéridos. En la región entre 1460 y 1231 cm^{-1} se observa una banda ancha con varios picos, este rango se asocia a la presencia de vibraciones de flexión C-H en CH_2 y CH_3 .

Luego se visualiza una banda en 1165 cm^{-1} , característica de las vibraciones de tensión C-O y en 1114 cm^{-1} se observan vibraciones de tensión O- CH_2 . Por último se ven claramente en 722 cm^{-1} , las vibraciones de flexión correspondiente a $(\text{CH}_2)_n$ con $n > 4$ propias de esqueletos carbonados de considerable longitud.

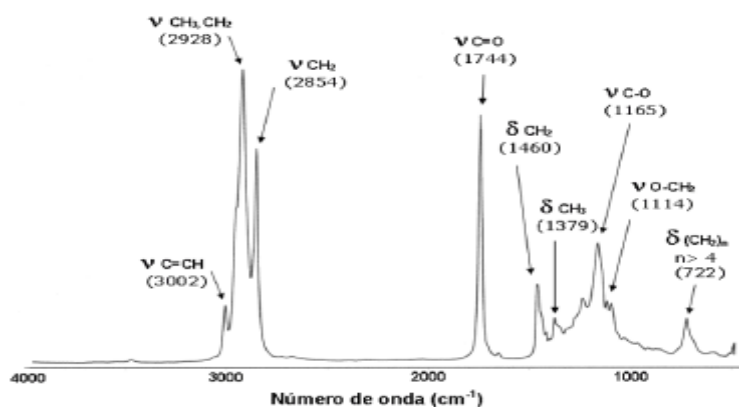


Figura 2. Espectro FT-IR del aceite de almendras comercial

En la [Figura 3](#) se muestran los espectros de absorción en la región del infrarrojo medio (MIR) de a) aceite de almendras obtenido en frío, b) aceite de almendra comercial y c) aceite de almendras obtenido a reflujo.

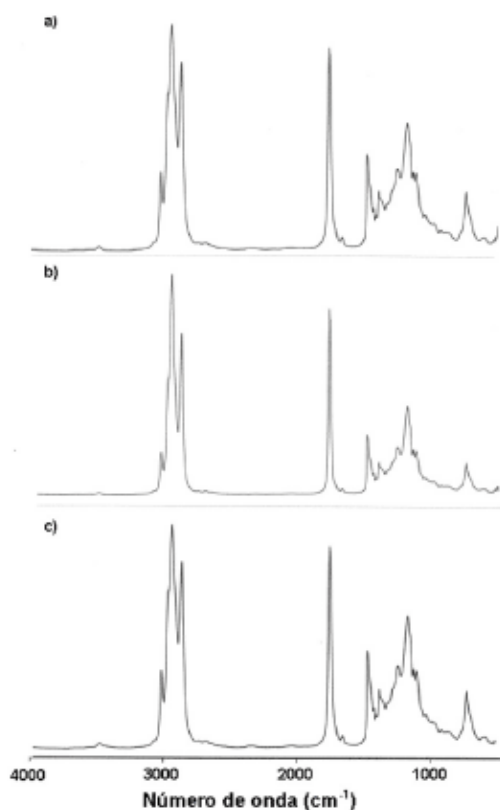


Figura 3. Espectros de absorción en la región del infrarrojo medio (MIR) de: a) aceite de almendras obtenido en frío, b) aceite de almendra comercial y c) aceite de almendras obtenido a reflujo

Se observa que son idénticos en cuanto a la frecuencia de absorción de los picos. Los tres espectros prácticamente se sobreponen; indicando, en principio, que estos aceites comparten los mismos grupos funcionales: el grupo carboxilo, el esqueleto alifático y el número y posición de los dobles enlaces.

Consideraciones finales.

En la literatura se encuentran disponibles diferentes metodologías para la obtención del aceite de almendras en las cuales se discuten las variables involucradas en el proceso realizado, por ejemplo, cantidad de material, tipo de disolventes, temperatura de extracción, tiempo de extracción, técnica empleada de extracción, etc.

El principal objetivo de este trabajo es obtener en una clase práctica de química orgánica una sustancia de importante valor económico, utilizando materiales comunes presentes en un laboratorio de química, así como analizar su composición química mediante espectroscopia FT-IR y su posterior aplicación, logrando el interés de los alumnos de realizar el experimento y discutir respecto de las ventajas de los métodos involucrados.

Por otra parte se utilizan variadas técnicas experimentales por medio de las cuales se logra involucrar estrechamente al alumno con la ciencia y la tecnología.

El objetivo es vincular al estudiante con los conceptos teóricos necesarios para la comprensión del desarrollo experimental estimulando al mismo para la construcción de su conocimiento y promoviendo la importancia que los contenidos tienen en actividades que se relacionan con su entorno.

REFERENCIAS.

1. Hernandez, Sandra A. y Zacconi, Flavia C. M. *Aceite de almendras dulces: extracción, caracterización y aplicación*. Quím. Nova. 2009, vol.32, n.5
2. Trease, E. G.; Evans, W. C.; *Farmacognosia*, 13^a ed., Interamericana - Mc.Graw Hill: México, 1989.
3. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Contemporary Approach*, 3rd ed., Saunders College Publishing: New York, 1995.
4. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.
5. Lopes, W. A.; Fascio, M.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 670.
6. Masmoudi, H.; Dreau, Y. L.; Piccerelle, P.; Kister, J.; *Int. J. Pharm.* **2005**, 289.
7. Acevedo Díaz, J. A.; *Rev. Eureka. Enseñ. Divul. Cien.* **2004**, 1, 3. (CA-57/2003).
8. www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S464A.pdf

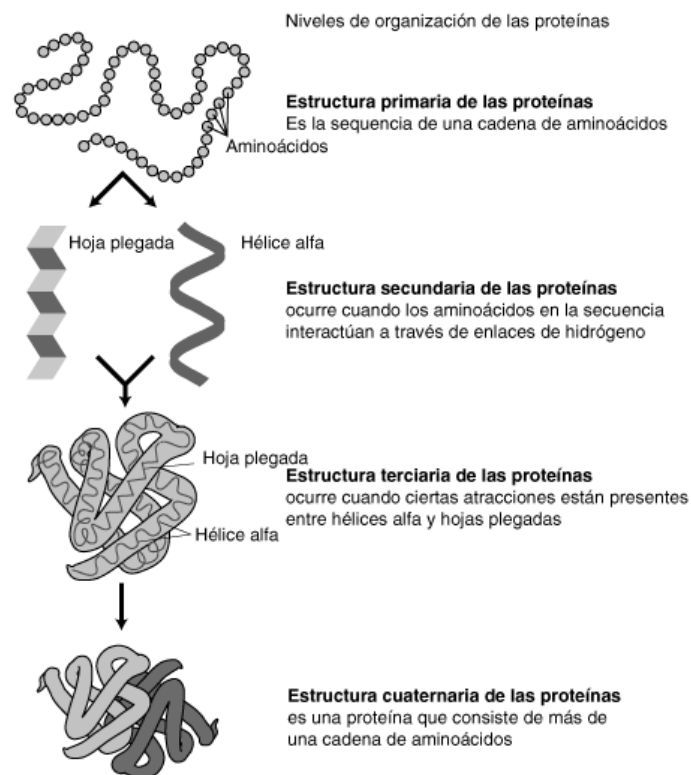
PRÁCTICA V-UV 08. Determinación cuantitativa de proteínas totales por espectroscopía visible. Método del *biuret*, Método de Folin-Ciocalteu y descripción de otros métodos.

Introducción.

Las proteínas son las moléculas orgánicas típicas de los seres vivos, en cuya composición entran fundamentalmente C, N, O, H. Casi todas contienen también S y P, y algunas pueden incluir Fe, Cu, etc.

Están compuestas por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, es decir, por amidas entre el grupo α -amino de un aminoácido y el carboxilo de otro. Se forman así largas moléculas que pueden incluir desde casi un centenar de aminoácidos hasta varios miles en secuencia no ramificada de enlaces peptídicos.

Muchas proteínas por hidrólisis dan solo aminoácidos: son las llamadas *proteínas simples*. Las *proteínas conjugadas* contienen además de la cadena polipeptídica algún otro componente orgánico o inorgánico llamado grupo prostético. Según la naturaleza química de este último, se habla de: nucleoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas, glicoproteínas, etc.



El orden o secuencia de los aminoácidos de una cadena polipeptídica recibe el nombre de ESTRUCTURA PRIMARIA de la proteína. Los diversos tramos de la cadena suelen presentarse en alguna orientación preferente en el espacio constituyendo lo que se llama ESTRUCTURA SECUNDARIA.

Los diferentes tramos de estructuras secundarias pueden plegarse formando lo que se llaman ESTRUCTURA TERCIARIA. Distintas cadenas polipéptidicas se pueden asociar formando lo que se llama ESTRUCTURA CUATERNARIA.

Todo ello configura una gran variedad de estructuras tridimensionales de las proteínas y se habla de *proteínas fibrosas* (queratina, colágeno), *proteínas globulares* (hemoglobina, la mayoría de las enzimas).

Otras veces las proteínas se clasifican por su solubilidad así se habla de *albúminas* (solubles en agua), *globulinas* (solubles en disoluciones salinas), *glutelinas* (solubles en ácidos y bases) y *prolaminas* (solubles en alcohol).

La secuencia de los aminoácidos en la cadena polipéptidica está determinada genéticamente de acuerdo con una correspondencia entre cada tres nucleótidos consecutivos de los ácidos nucleicos y cada uno de los veinte aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano y valina.

Reacción xantoproteica. Es una reacción para la identificación de proteínas; cuando las proteínas se tratan con ácido nítrico concentrado se origina un compuesto aromático nitrado de color amarillo. La prueba da resultado positivo en aquellas proteínas con aminoácidos portadores de anillos aromáticos, especialmente en presencia de tirosina. Si una vez realizada la prueba se neutraliza con un álcali vira a un color anaranjado oscuro. La forma de realizarlo experimentalmente consiste en poner de 2 a 3 ml de disolución de proteína (p.e. clara de huevo en agua) en un tubo de ensayo, añadir 1 ml de ácido nítrico concentrado, calentar a baño María hasta 100°C aprox., posteriormente enfriar con agua fría y añadir gota a gota disolución de hidróxido sódico al 40%. Otras muestras de proteínas pueden ser: caseína, gelatina, aspartamo, glicina, proteína vegetal de soja, etc.

Las proteínas contienen grupos funcionales que absorben luz en el ultravioleta (UV) y por lo tanto pueden ser utilizados para medir concentraciones por espectrofotometría. En particular, algunos residuos aminoacídicos absorben luz en el UV cercano. Por otra parte, el enlace peptídico presenta un máximo de absorbancia a $\lambda = 190$ nm.

Veamos en la siguiente tabla las características espectrales de cromóforos encontrados en las proteínas.

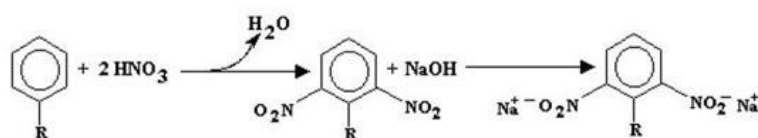
Cromóforo	λ (nm)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
Triptófano (Trp)	280	5500
Tirosina (Tyr)	275	1400
Fenilalanina (Phe)	257	200
Cistina (Cys-Cys)	250	300

La medida de la absorbancia a 205 nm A_{205} (longitud de onda cercana al máximo de absorbancia del enlace peptídico) es especialmente útil para medir concentraciones de proteínas o péptidos que no contienen *Trp*, *Tyr* o *Cys-Cys*.

Sin embargo tiene el inconveniente de que muchos compuestos que frecuentemente están presentes en las preparaciones de proteínas absorben luz también a esta longitud de onda.

Absorbancia a 280 nm. El triptófano (*Trp*), la tirosina (*Tyr*) y la cistina (*Cys-Cys*) absorben fuertemente luz ultravioleta a 280 nm. También la fenilalanina (*Phe*) absorbe a esta longitud de onda, pero en mucha menor medida. Esta propiedad permite medir la concentración de proteínas midiendo la absorción a 280 nm. Entre 0,5 y 2,0 es el orden de valores de A_{280} que pueden presentar soluciones de proteínas de concentraciones en torno a 1 mg/ml.

Para una mezcla de proteínas, la medida de la absorción A_{280} brinda una aproximación bastante fiable, sobre todo cuando se comparan mezclas de composición similar. Frecuentemente se utiliza el valor de A_{280} para expresar la concentración de proteínas. Las ventajas de este método son la relativa buena sensibilidad (50 – 100 μ g), la simplicidad y la rapidez de ejecución. Además, como la solución de proteínas no es sometida a ninguna reacción química, se puede recuperar la muestra si fuera necesario. Es particularmente útil para seguir la concentración de proteínas durante la elución de una cromatografía.



Reacción xantoproteica

Métodos y fundamento.

La determinación cuantitativa de la concentración de proteínas es una de las pruebas que más frecuentemente deben hacerse en el laboratorio de bioquímica. Primitivamente, la cantidad de proteínas se evaluaba midiendo la cantidad total de nitrógeno proteico, y teniendo en cuenta que este elemento representa aproximadamente el 16% del peso de una proteína. Este era un método largo y laborioso y con poca sensibilidad. La aparición de métodos calorimétricos ha permitido solventar estos dos inconvenientes.

El componente activo del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido mixto fosfomolibdowolfrámico: $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$

La reducción, por ejemplo por compuestos fenólicos, de este reactivo se manifiesta por la pérdida de uno, dos o tres átomos de oxígeno del wolframato y/o del molibdato, obteniéndose las especies de color azul.

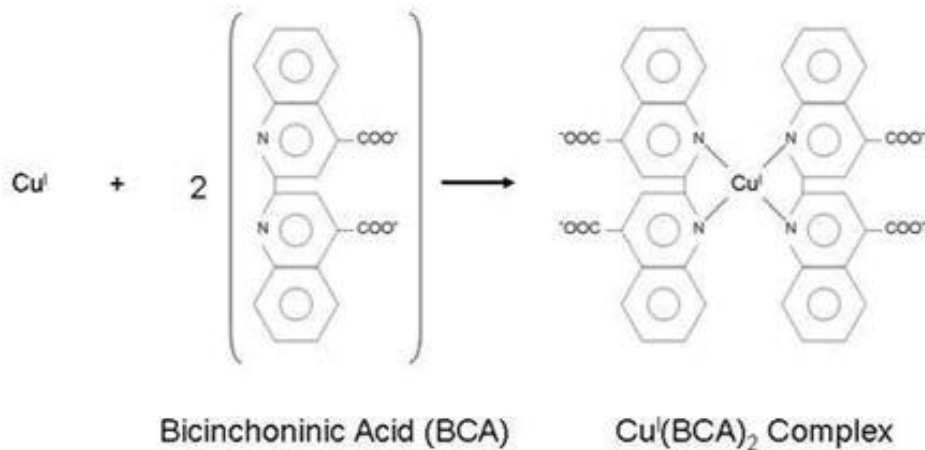
Además de la reacción del complejo biuret formado en la primera etapa, también contribuyen a la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu las cadenas laterales de algunos aminoácidos (Tyr, Trp y en menor medida Cys-Cys, Cys e His).

Este ensayo es mucho más sensible que la simple formación del complejo biuret. Pueden medirse cantidades de proteína del orden de unos pocos microgramos (25 a 500 microgramos).

La susceptibilidad a la composición aminoacídica de las proteínas es una de las desventajas del método. Además algunos agentes reductores frecuentemente utilizados en preparación de proteínas (β -mercaptoetanol, ditioneitol) y quelatantes de metales (EDTA), interfieren el ensayo.

Método del ácido bicinónico (BCA).

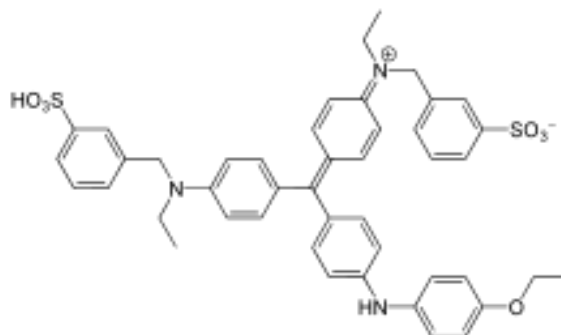
El principio de este ensayo es similar al del método de Lowry, ya que depende de la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ que es facilitada al formarse el complejo con el enlace peptídico.



El Cu^+ forma un complejo de color púrpura con el BCA, este complejo presenta un máximo de absorbancia a 562 nm. Una de las mayores ventajas de este ensayo es que es compatible con varios detergentes, iónicos y no iónicos, que se usan para la solubilización de proteínas.

Método de Bradford.

Algunas moléculas presentan afinidad por las proteínas y pueden fijarse a estas de manera no covalente. El ensayo de Bradford se basa en la unión no covalente del **Azul de Coomassie** a las proteínas.



El azul de Coomassie (Coomassie blue o Coomassie Brilliant blue) es un colorante derivado del trifenilmetano.

Este compuesto presenta diferentes espectros de absorción según el estado de protonación en el que se encuentra: la forma catiónica es de color rojo amarronado (máximo de absorción a 470 nm), la neutra es verde (máximo a 650 nm) y la aniónica es azul (máximo a 595 nm). La presencia de proteínas favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la forma aniónica debido a la interacción de los grupos sulfónicos del azul de Coomassie con los grupos catiónicos de las cadenas laterales de algunos residuos aminoácidos de las proteínas (principalmente *Arg* y *Lys*), produciéndose entonces la coloración azul que puede medirse a longitud de onda de 595 nm.

Entre las principales ventajas de este ensayo está su sencillez ya que se lleva a cabo en un solo paso (se mezcla el reactivo con la solución de proteína, se incuba en un corto tiempo y se mide A_{595}). Sin embargo comparado con algunos de los métodos anteriores, el ensayo de Bradford depende aun más fuertemente de la composición aminoacídica de la proteína que se mide. Se han señalado variaciones de respuesta entre distintas proteínas de hasta 50 veces. Las sustancias que interfieren el ensayo son menos numerosas que las que interfieren el método de Lowry. No obstante debe tenerse en cuenta la presencia de detergentes tales como Triton X100 o el dodecil sulfonato de sodio que interfieren el ensayo.

Equipos, materiales y reactivos.

- Espectrofotómetro Visible – UV y cubetas vidrio 1 cm de paso óptico.
- Balanza analítica.
- Baño termostatzado.
- Agitadores magnéticos con calefacción.
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Material general de laboratorio.
- Muestra problema de proteínas.
- Disolución patrón de proteínas de 10 mg/ml.
- **Reactivo del biuret:** Disolver 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6 g de tartrato sódico-potásico $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, en 500 ml de agua destilada. Adicionar agitando constantemente 300 ml de NaOH al 10% w/v. Añadir 1 g de KI y diluir a un litro con agua destilada.
- **Disolución A:** Na_2CO_3 anhidro, 2% w/v en NaOH 0.1 molar.
- **Disolución B:** $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5% w/v en tartrato sódico potásico 1% w/v.
- **Disolución C:** Mezclar 50 ml de disolución A con 1 ml de disolución B en el momento de la prueba.
- **Reactivo de Folin-Ciocalteu** comercial, diluido 1:2 en el momento de usar.

Modo de operar.

Se trata de determinar la cantidad de proteínas de una disolución problema (huevo, yogurt, cuajo, extracto de soja, etc.) desarrollando un compuesto coloreado y midiendo su absorbancia por espectroscopía visible. La prueba del biuret se basa en la formación de un complejo violáceo cuando el CuSO_4 en medio alcalino reacciona con compuestos que contengan dos o más enlaces peptídicos. La intensidad del color es una medida del número de enlaces peptídicos. El nombre de la **prueba "biuret"** es debido a que el compuesto denominado biuret ($\text{H}_2\text{NCO-NH-CONH}_2$) da la reacción positiva típica. Los inconvenientes de esta prueba es que no es del todo específica de enlaces peptídicos y además requiere cantidades de proteínas relativamente altas (entre 1 a 20 mg).

La **prueba de Folin-Ciocalteu** es bastante más sensible (25 a 500 μg). La aparición del color es debida a la formación de un complejo de cobre y a la reducción del fosfomolibdato y fosfowolframato presentes en el reactivo por compuestos fenólicos tales como tirosina.

Prueba "biuret":

A partir de la disolución estándar de 10 mg/ml, hacer una curva de calibración de 6 puntos, por ejemplo una serie compuesta por 0 ml (control), 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml y 0,5 ml del patrón en 6 tubos de ensayo, llevar en todos ellos el volumen hasta 1 ml añadiendo agua desionizada. Además preparar otro tubo con la solución problema de proteínas diluida en su caso para que entre en escala.

Adicionar 2 ml de reactivo de Biuret en cada tubo de ensayo, homogeneizar convenientemente y dejar 30 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo completo del color (tono violáceo). Al cabo de ese tiempo medir la absorbancia en el espectrofotómetro en cubetas de PS 1 cm a longitud de onda de 540 nm frente a blanco; si se realiza previamente un espectro visible y se determina un máximo más idóneo se podría utilizar este para la determinación.

NOTA: dado que se trabaja con volúmenes pequeños prestar especial cuidado y siempre debe quedar llena la cubeta en más de sus $\frac{3}{4}$ partes.

Dibujar la recta de calibrado y obtener la concentración de proteínas en la muestra problema.

Prueba de Folin-Ciocalteu.

Pipetear una serie de 6 tubos de ensayo conteniendo: 0 (control), 0.05, 0.1, 0.25, 0.50 y 1.0 ml de la disolución estándar diluida convenientemente en diversos tubos de ensayo. Llevar en todos ellos el volumen hasta 1 ml con agua destilada o desionizada. Además preparar un tubo que contengan 1 ml de la muestra problema diluida p.e. 1:200, en su caso. Adicionar 5 ml del reactivo C a cada tubo agitar esperar diez minutos y añadir a todos los tubos 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (recientemente diluido) y mezclar rápidamente.

Después de 30 minutos medir la absorbancia en el espectrofotómetro con cubetas de PS de 1 cm a la longitud de onda de 750 nm (tono azulado) contra un blanco de referencia. Caso de realizar espectro se puede elegir una longitud de onda de máximo más idóneo (733 nm para el equipo *Vis-UV Cary 1E*).

Informe y resultados.

Determinar a partir curva de calibrado la concentración de las muestras problemas analizadas. Aportar registros.

NOTA IMPORTANTE: prestar especial atención a la **CANTIDAD** de reactivo que vamos a necesitar, si son necesarios todos o hay alguno alternativo, a la **CALIDAD** del mismo (QP, PA, espectroscopía, cromatografía, patrón primario, material de referencia, etc.) así como sus **RIESGOS PARA LA SALUD Y PRECAUCIONES** a tomar y cuando por la importancia del valor de la concentración es necesario **medir y aforar con exactitud**.

Así como si el **instrumental** que empleamos es **preciso y se encuentra calibrado**, principios fundamentales de toda buena práctica de laboratorio (BPL o GLP).

Se trata de utilizar los reactivos de forma racional y evitar desperdicio innecesario y riesgos medioambientales en su eliminación.

Cuestiones.

- 1.- ¿Qué se entiende por proteína conjugada?
- 2.- ¿Qué diferencias existen entre los diversos métodos de análisis de proteínas expuestos en métodos y fundamento?
- 3.- ¿A que se llama punto isoeléctrico de una proteína?

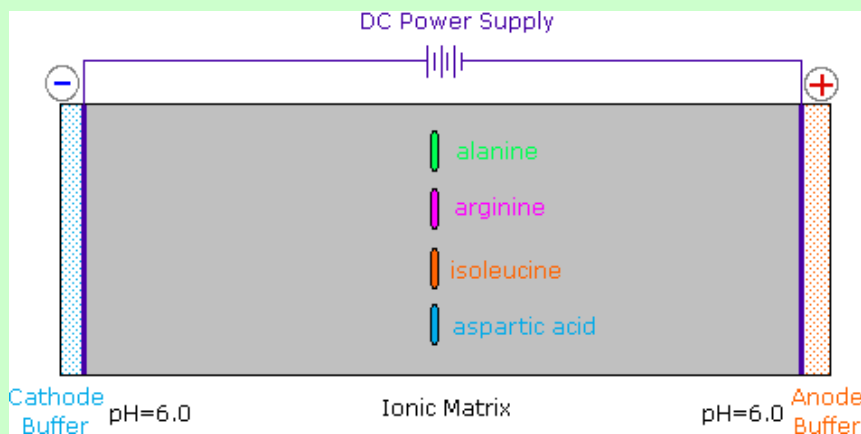
REFERENCIAS.

1. Lozano, J.A. y Tudela, J. “Prácticas de bioquímica: Experimentación y simulación. Cap. XV. Ed. SINTESIS, (1989) Madrid.
2. Brewster, R.Q. y otros. “Curso práctico de Química Orgánica”. Ed. ALHAMBRA. Madrid.
- 3.- Facultad de Ciencias. Bioquímica (Licenciatura en Ciencias Biológicas). Bioquímica I. Laboratorio práctico: Dosificación de proteínas, 2006.
- 4.- <http://es.scribd.com/doc/15958125/1-PROPIEDADES-QUIMICAS-FISICOQUIMICAS-DE-LAS-PROTEINAS#scribd>.
- 5.- acasti.webs.ull.es/docencia/practicas/4.pdf

Existe un pH para el cual la carga eléctrica media de las moléculas es cero. Este pH se llama punto isoeléctrico (pI). El pI es el pH en el que la molécula se disocia por igual en ambos sentidos, y como equidista de los dos valores de pK, puede obtenerse por su semisuma:

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

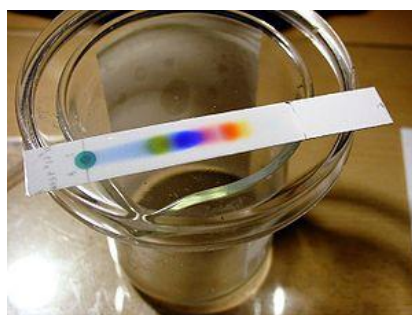
Así, para la glicina (pK1=2,22 y pK2=9,86, el pI vale 6,04. Así, a pH=6,04 la inmensa mayoría de las moléculas de glicina estarían en forma de iones híbridos (zwitterión) y no se desplazarían hacia ningún polo al aplicarles un campo eléctrico



PRÁCTICA CCF 09. Cromatografía en capa fina. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina.

Introducción.

La cromatografía en capa fina (CCF) es un caso de cromatografía de adsorción (TLC en inglés), es muy utilizada en los laboratorios ya que es una técnica analítica rápida y sencilla. Entre otras cosas permite identificar compuestos, determinar el grado de pureza de un compuesto, por ejemplo para determinar la efectividad de una operación de purificación. Comparar muestras, así si dos muestras se desplazan igual en la placa podrían ser idénticas, si por el contrario recorren distancias distintas no son la misma sustancia. También permite realizar el seguimiento de una reacción, es posible estudiar como desaparecen los reactivos y como aparecen los productos finales, es decir saber cuando la reacción ha acabado.



CCF de una muestra de tinta negra.

El funcionamiento de la técnica es el siguiente, la muestra a analizar se deposita en muy pequeña cantidad en un extremo de la placa cromatográfica que dispone de una fina capa de adsorbente (FASE ESTACIONARIA). A continuación la placa se coloca verticalmente dentro de una cubeta cromatográfica cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (FASE MOVIL ó ELUYENTE). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de las sustancias presentes en la muestra.

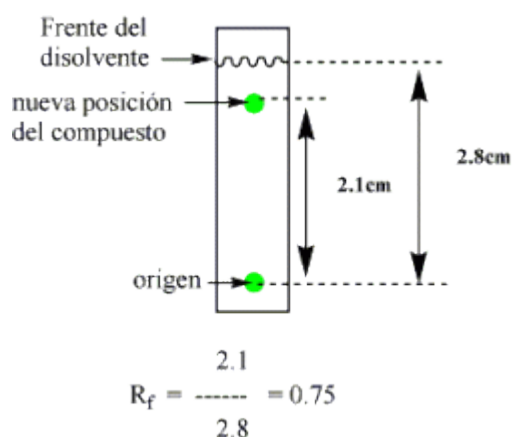
Los dos adsorbentes más ampliamente utilizados son el **gel de sílice** (SiO_2) y la **alúmina** (Al_2O_3) ambos de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares como hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas. El gel de sílice se utiliza para sustancias más polares por ejemplo alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos, etc. El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. Este debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición.

El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados son: HEXANO < TETRACLOROMETANO < TRICLOROMETANO < DICLOROMETANO < ACETATO DE ETILO < ACETONA < 2-PROPANOL < METANOL < AGUA. En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad lo que les permite desplazarse con rapidez en la placa. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol; normalmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable.

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y selectividad en la separación depende de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar y que están en función de la POLARIDAD del compuesto, los compuestos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras los no polares se eluirán con mayor facilidad y de la NATURALEZA DEL DISOLVENTE, así para un mismo compuesto un aumento de la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como **R_f** y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.) debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa.

$$R_f = \text{Distancia recorrida por el compuesto} / \text{Distancia recorrida por el eluyente}$$



La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha, si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo de R_f .

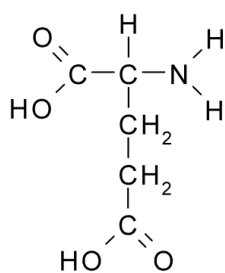
Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un Rf medio en torno a 0,3 a 0,5. Para componentes poco polares se debe utilizar un disolvente apolar como hexano, en el caso de compuestos con polaridad media, se recomienda utilizar mezclas de hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Las sustancias más polares requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano / metanol en distintas proporciones.

Revelado de las placas. La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz UV (254 nm). El indicador absorbe la luz ultravioleta y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto y el resultado es la visualización de una mancha en la placa.

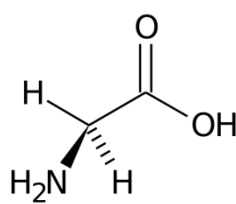
En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización o revelado del cromatograma requiere utilizar un agente revelador; este tiene que reaccionar con los compuestos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados.

Fundamento.

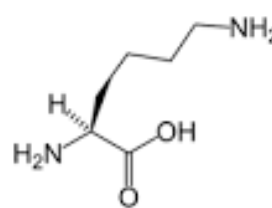
El estudio y caracterización de las distintas biomoléculas (azúcares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) requiere en numerosos casos de su aislamiento y purificación a partir de mezclas complejas como son los preparados de cualquier material biológico. Se procederá a la separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en capa fina.



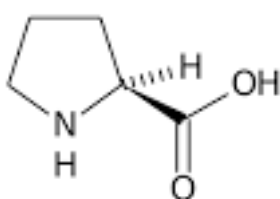
Glutamato



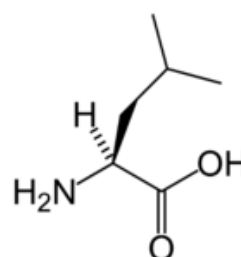
Glicina



Lisina



Prolina



Leucina

Se empleará como agente revelador ninhidrina. La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico con reducción del reactivo ninhidrina a hidrindantina que origina un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, con la excepción de la prolina que da una coloración amarillenta. La técnica es muy sensible por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos.

Agente revelador	Compuestos
Ácido fosfomolibdico	Recomendado para compuestos fácilmente oxidables
Ácido sulfúrico	Azucares y compuestos que se pueden deshidratar
Yodo	Insaturados y aromáticos
Ninhidrina	Aminas, aminoácidos y aminoazucares
Vainillina	Alcoholes y fenoles
Permanganato potásico	Insaturados o fácilmente oxidables

Objetivos.

Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice.

Revelado de los aminoácidos mediante la reacción coloreada con la ninhidrina.

Cálculo del valor de **R_f** para cada aminoácido. Justificación de las diferencias de R_f de los distintos aminoácidos.

Identificación de la naturaleza de aminoácidos desconocidos.

Equipos, materiales y reactivos.

Placas de silicagel para cromatografía en capa fina.

Cubeta para desarrollo cromatográfico.

Pulverizadores.

Estufa desecación.

Secador de aire.

Probetas, pipetas, vasos precipitados.

Capilares para aplicar muestras.

Pipetas Pasteur.

Material general de laboratorio.

Aminoácidos: glutamato, glicina, lisina, prolina, leucina, solución problema de aminoácidos.

Etanol

Hidróxido amónico

Ninhidrina.

Disoluciones necesarias.

- 1.- Disolución de los diversos aminoácidos al 1%. Se prepara pesando 1,000 g de aminoácido, disolver en 10 ml de n-propanol y diluir con agua destilada en matraz aforado hasta 100 ml.
- 2.- Solución de eluyente. Se preparan primero 100 ml de una disolución de hidróxido amónico al 34 %. La solución de eluyente se prepara con etanol del 96% y disolución de hidróxido amónico en la proporción 7:3, es decir para 300 ml del reactivo (210 ml de etanol y 90 ml de disolución de hidróxido amónico).
- 3.- Solución reveladora. Se prepara en el momento de su uso. Disolver 0,2 g de ninhidrina en agua destilada y completar hasta 100 ml.

Modo de operar.

Sobre una placa de silicagel para cromatografía TLC se traza con un lápiz una recta paralela a uno de los bordes y a una distancia de este de 2 cm, prestar especial cuidado de no llegar al sustrato de aluminio al trazar la línea con lápiz. Sobre esta línea se ponen seis puntos equidistantes.

ADVERTENCIAS:

NO se debe tocar la parte de *silicagel* de la placa **con las manos**, ya que la contaminaríamos con nuestros propios aminoácidos.

NO utilizar nunca bolígrafo ni rotulador para marcar. **NO horadar** la placa cuando se marque.

En cada punto, identificado con el nombre de los aminoácidos, se aplican tres **microgotas** de las disoluciones de aminoácidos y problema. **Se utilizará un capilar** para aplicar cada microgota.

Muy importante, **secar con el secador de aire las disoluciones de aminoácidos aplicadas**, antes de eluir.

Se añade al tanque cromatográfico eluyente hasta una altura aproximada de 1 cm y sin que éste alcance la zona de aplicación de las muestras. Se coloca la placa cromatográfica en la cubeta, **SE TAPA** y se deja desarrollar la cromatografía hasta que el eluyente este cerca del borde superior, **SIN LLEGAR A SOBREPASARLO**, de vez en cuando revisar la placa.

Se debe operar en campana extractora por la posible toxicidad de los compuestos empleados.

Terminada la cromatografía se retira la placa, se marca con un lapicero la línea del frente de eluyente, se seca dentro de la campana de gases con un secador de aire y se rocía, **dentro de la campana**, con un pulverizador o nebulizador que contiene el revelador, en este caso ninhidrina.

A continuación la placa se seca bien con el secador de aire o bien dentro de estufa desecación. Aparecerán las manchas coloreadas de los distintos aminoácidos.

Resultados y discusión.

Determinar R_f para cada aminoácido y la composición de la solución problema justificando como se ha llegado a la misma.

Se deben justificar las diferencias en los valores R_f de cada uno de los aminoácidos, así como las formas de la mancha, color e intensidad. A partir de la estructura química hay que relacionar el mayor o menor valor de R_f con la mayor o menor solubilidad en las fases estacionaria y móvil.

Cuestiones.

- 1.- ¿Qué se podría decir de la resolución de la técnica y cómo podría aumentarse ésta?
- 2.- ¿Qué ocurriría si la longitud de la placa se incrementara de 20 a 100 cm o si se aumentara el tiempo de elución de 2 a 20 horas?

Referencias.

- 1.- <https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>
- 2.- <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11%20CROMATOGRAF%C3%8DA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20AAs.pdf>
- 3.- Louisot Pierre. *Bioquímica estructural*. Editorial ALFA CENTAURO S.A. (1982)
- 4.- J. G. Feinberg and I. Smith. *Paper and thin layer chromatography & electrophoresis*. Longman, (1972)

Aminoácido	Valor aproximado de R_f Eluyente (n-butanol, ac. acético y agua 4:1:1)	Valor aproximado de R_f Eluyente (n-propanol y agua 7:3)
Alanina	0.29	0.50
Monohidrocloreuro de arginina	0.15	0.15
Asparagina	0.20	0.43
Cistina	0.12	0.22
Ácido glutámico	0.33	0.40
Glicina	0.22	0.39
Leucina	0.57	0.69
Lisina	0.10	0.20
Metionina	0.47	0.63
Serina	0.25	0.45
Triptófano	0.55	0.71
Tirosina	0.52	0.69
Valina	0.40	0.60

PRÁCTICA CCF 09-bis. Separación de pigmentos vegetales por cromatografía en capa fina. Diversos pigmentos de la espinaca.

Sin duda alguna la **cromatografía en capa fina** (*Thin Layer Chromatography*) continua siendo la técnica de análisis de mezclas más versátil, fácil de emplear y más económica de uso en el laboratorio. Se han encontrado gran número de aplicaciones con tratamientos sencillos de la muestra analizada, como en análisis y producción de fármacos, industria química, toxicología ambiental, química de alimentos, análisis de aguas, cosmética, fitoquímica, biología, entre otras.

La TLC, forma parte de una gran familia de técnicas cromatográficas entre las que se encuentran la cromatografía en columna (CC), la de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como las más habituales. Las técnicas cromatográficas constituyen una herramienta fundamental en los laboratorios analíticos y de investigación por lo que su conocimiento es muy importante.

En este caso se van a identificar los pigmentos constitutivos de la espinaca.



Introducción.

La técnica de separación de TLC consta de un sistema de dos fases una sólida (FASE ESTACIONARIA) que se aplica en forma de capa delgada (0,10 a 0,25 mm de espesor) para fines analíticos y en caso de que se quiera aplicar para aislar un compuesto (espesor de 0,5 a 2 mm). Esta capa se encuentra fijada a un soporte normalmente aluminio, plástico o vidrio. A través de la fase estacionaria transita una FASE MOVIL o líquido eluyente.

El medio donde se adsorbe la muestra debe ser inerte, poroso e insoluble en los solventes usados como fase móvil. Existen diferentes materiales inertes pero los más usuales son: **silicagel** y **óxido de aluminio**. Sin embargo para una separación óptima es conveniente escoger el material a emplear.

En la siguiente tabla se especifican los sorbentes más habituales.

Material sorbente	Compuestos a separar
Silica gel	Toda clase de compuestos
Oxido de aluminio	Compuestos básicos (alcaloides, aminas, etc.), esteroides, terpenos, hidrocarburos aromáticos y alifáticos.
Celulosa	Aminoácidos y derivados, aditivos alimentarios (ácidos y básicos) carbohidratos.
Kieselguhr	Carbohidratos, aflatoxinas, herbicidas, tetraciclinas.
Poliamida	Fenoles, flavonoides, nitrocompuestos.
Silicagel con amino enlazado	Optimo para carbohidratos, fenoles, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, nucleótidos, nucleóxidos.
Silicagel con ciano enlazado	Especialmente adecuado para pesticidas, esteroides y biocidas.
Silicagel con diol enlazado	Bueno para la separación de esteroides y hormonas.
Silicagel con fase reversa (RP)	Mejora la separación de compuestos apolares como esteroides, tetraciclinas, ftalatos, antioxidantes, lípidos, barbitúricos, capsaicinas, aminofenoles, ácidos grasos.
Silicagel con modificación quiral	Particularmente útil para separación de enantiómeros de aminoácidos, halogenados, péptidos simples, α – hidroxíácidos.
Silicagel impregnada con nitrato de plata	Lípidos, hidrocarburos saturados e insaturados con sus isómeros geométricos.
Silicagel impregnado con cafeina	Particularmente selectivo en la separación de hidrocarburos poliaromáticos.
Silicagel impregnado con ácido bórico/fosfato	Selectivo para carbohidratos.

Como vemos el silicagel es una fase estacionaria universal, también llamado **ácido silícico o kieselgel**, es un polvo blanco, poroso y amorfo. Este material, por policondensación se agrupa en partículas que van aumentando su tamaño y una vez se elimina el agua da lugar a la formación de un gel. El control de la temperatura y pH es crucial para la calidad del gel formado. Una vez que se forman las partículas coloidales se agrupan en una red tridimensional descrita como hidrogel. Posteriormente se somete a un lavado y calentamiento a 120°C, con lo que se forma un gel poroso y duro llamado xerogel o silica gel.

La estructura se encuentra unida por enlaces de silicio y oxígeno denominados grupos siloxano. Los grupos hidroxilo sobre la superficie del material confieren gran parte de las propiedades adsorptivas del material, se constituyen diferentes grupos hidroxilo sobre la superficie del material así tendremos grupos monohidroxil, dihidroxil geminal, trihidroxil vecinal.

La hidratación del gel es del orden del 11 – 12%, cuando la humedad ambiental del recinto de ensayo es del orden del 50% a 20°C. En estas condiciones la placa de silicagel es adecuada para su uso y no requiere activación. La activación solo será necesaria si la placa de TLC ha sido expuesta a una humedad elevada y por tanto será necesario activarla calentándola a 105°C durante 30 minutos seguido por secado en desecador con máximo 40% de humedad relativa.

La eficacia del silicagel en la separación está relacionada con el tamaño de partícula, normalmente este tamaño está comprendido entre 5 y 40 micras, y cuanto más pequeño sea su valor mayor será la resolución. El tamaño de poro también es un parámetro fundamental que incide en la buena separación, normalmente el tamaño de poro se encuentra entre 40 a 200 Å, el silicagel común tiene un tamaño de poro de 60 Å.

Preparación y aplicación de la muestra.

El pretratamiento de la muestra para TLC suele ser sencillo y no requiere más que algunos pasos sencillos. Requiere la extracción de los componentes de interés con un disolvente adecuado. La presencia de contaminantes en la muestra no causa problemas en TLC ya que las placas se usan una sola vez. Aunque la muestra se deposite junto con los contaminantes, estos permanecerán en el origen o próximos a él mientras que los componentes de interés avanzarán con el frente del eluyente.

Si el disolvente de la muestra es acuoso o viscoso, la dilución con disolvente orgánico polar como: metanol, etano o acetonitrilo, ayuda a la aplicación de la muestra sobre la fase estacionaria.

La operación de filtrado, en su caso también puede ayudar a la eliminación de ciertas partículas que puedan interferir en el resultado final del cromatograma.

Una vez preparada la muestra se aplica con un tubo sub-capilar o microjeringa, es muy importante depositar microgotas que formen un punto esférico lo menor posible.

La cámara cromatográfica consiste en un recipiente de vidrio con tapa y suficientemente alto para que quepa la placa cromatográfica y se pueda desarrollar bien la separación de componentes.

En este recipiente y para el caso de pigmentos vegetales se le añade el eluyente o fase móvil que contendrá: 60% de éter de petróleo (PE 35-60), 16% de ciclohexano, 10% de acetato de etilo, 10% de acetona y 4% de metanol. La cantidad que se agrega depende del origen de la placa cromatográfica. El origen suele estar situado a 0,5 cm a 1 cm del extremo de la placa por lo que el nivel de eluyente debe quedar por debajo de este límite. Se tapa y se deja unos minutos a que se sature la atmósfera interna del recipiente, ANTES de introducir la placa cromatográfica con la muestra, que por supuesto debe estar ya seca sobre la superficie de silicagel.

Aplicación de la muestra.

Con ayuda de un tubo sub-capilar se aplica la muestra sobre la placa formando un punto. Se puede depositar la cantidad necesaria acercando y alejando el tubo sub-capilar durante segundos pero nunca dejándolo quiete apoyado. En este caso hasta obtener un tono verde de intensidad media.

Se deja secar o se seca con secador de pelo y se introduce en la cámara de cromatografía, se deja el tiempo suficiente que permita la separación adecuada de los componentes (buena resolución) pero que el frente de eluyente NO REBASE el extremo superior de la placa.

Una vez finalizada la elución, se saca la placa, se marca inmediatamente con un lápiz el frente de elución y se deja secar.

Calcule a continuación los R_f . En la tabla siguiente se indican los factores de retarde orientativos de cada componente del color de la espinaca.

Pigmento	R_f
B-caroteno	0,95
Clorofila a	0,44
Clorofila b	0,32
Xantofila	0,16
Feofitina a	0,60
Feofitina b	0,49

Las feofitinas a y b puede que no aparezcan, ya que son resultado de la descomposición de la clorofila a y b por efecto de luz, aire y agua durante la manipulación de la muestra de espinaca. Pueden aparecer dos manchas más por debajo y por encima de R_f 0,16, se presume que pueden ser varias clases de xantofilas.

PRÁCTICA ELECTROFORESIS, EFP-10. Fundamento y metodología para la separación de proteínas en geles de poliacrilamida por electroforesis.

La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran. Como consecuencia, se desplazan cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Se denomina **electroforesis** a la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Se trata de una técnica fundamentalmente analítica, aunque también se puede realizar con fines preparativos. Cada molécula se desplaza por efecto del campo, alcanzando rápidamente una velocidad constante al equilibrarse la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) con la resistencia al avance (fuerza de fricción o rozamiento) impuesta por el medio en el que se desplaza.

Fuerza del campo eléctrico = Fuerza de fricción

$$q \cdot \Delta E = f \cdot \Delta v$$

q = carga (C)

E = intensidad del campo (V/m =
N/C)

f = coeficiente de fricción (C·V·s / m² =
kg/s)

v = velocidad de la molécula (m/s)

El coeficiente de fricción mide la resistencia intrínseca debida a las características de cada molécula, esencialmente su forma y su tamaño. Así, por ejemplo, las moléculas grandes y asimétricas poseen un mayor coeficiente de fricción que las pequeñas y compactas.

La velocidad por unidad de campo recibe el nombre de **movilidad electroforética, μ**

$$V \cdot E = \mu = q \cdot f = Z e f$$

(Z = número entero; e = carga del electrón).

En unas condiciones determinadas de electroforesis, la diferente movilidad de cada molécula define su separación en el espacio; al ir transcurriendo el tiempo, se van separando progresivamente unas de otras.

Al ser el medio de soporte a su vez un polielectrolito, está constituido por iones, que son atraídos y así recubren los iones de la muestra, lo que altera el comportamiento de éstos en el campo. Todo ello hace que el tratamiento teórico cuantitativo de la electroforesis sea muy difícil y que esta técnica resulte poco útil para obtener información precisa sobre la estructura de las moléculas. Sin embargo, es enormemente útil como técnica analítica y preparativa.

Se suele hablar de 3 tipos de electroforesis:

1. **De frente móvil:** los componentes de la muestra están presentes en toda la disolución y se determina ópticamente la posición del frente de avance o frontera con el disolvente.
2. **Zonal:** la muestra se aplica como una mancha o banda y sus componentes migran a través de un disolvente, utilizando además un medio que soporta a éste. En este caso no se determina la movilidad, sino que el único objetivo de la técnica es separar los componentes de la muestra.
3. **Continua:** la muestra se aplica también en una zona, pero se suministra continuamente a lo largo del proceso (para más información, véanse las pp.250-2 de Freifelder, 1999).

Estudiaremos únicamente la electroforesis zonal, de uso más extendido.

Finalmente, debe señalarse que, aunque es menos frecuente, también se puede aplicar la electroforesis para la separación de células.

La muestra debe situarse en o sobre un medio soporte, principalmente para evitar perturbaciones mecánicas y corrientes de convección durante la separación. En algunos soportes (papel o similares) la muestra queda sobre la superficie y avanza a lo largo de ella, con escasa fricción, por lo que el mecanismo principal de separación es la magnitud de la carga de cada componente de la muestra. Otros medios de soporte ("geles", medios semisólidos o gelatinosos) están formados por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra, que queda embebida en el medio de soporte electroforético. Como consecuencia, la fricción es notable y los factores de forma y tamaño adquieren una alta relevancia en la separación.

Medios de baja fricción

papel
acetato de celulosa

*separación principalmente por
carga*

Medios de elevada fricción

gel de almidón	gel de poliacrilamida
gel de agarosa	gel de agarosa+poliacrilamida

separación por carga, tamaño y forma

Soportes o sustratos:

Papel: sencillo, pero con elevada adsorción debido a los grupos hidroxilo de la celulosa.

Acetato de celulosa: los grupos –OH están acetilados, lo que reduce la adsorción; baja tinción de fondo; es posible transparentarla o disolverla para detectar y recuperar los componentes separados.

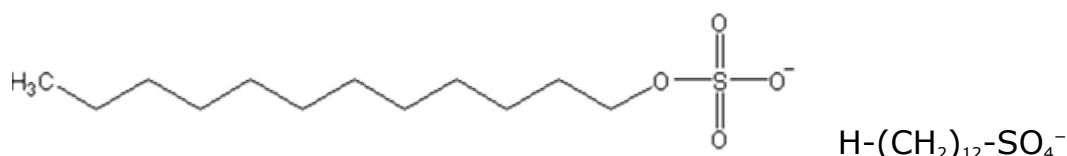
Almidón: pasta de almidón cuyos granos se han disgregado en un tampón caliente (se hinchan). Actualmente se utiliza poco, ha sido sustituido por la poliacrilamida.

Agarosa: polisacárido, producto purificado de algas (composición similar al agar-agar). Se disuelve en caliente (50-60°C) y al enfriar solidifica formando un gel, de alta porosidad.

Poliacrilamida: el gel es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Regulando la concentración de ambas y su proporción se consiguen distintas porosidades, siempre menores que la de los geles de agarosa.

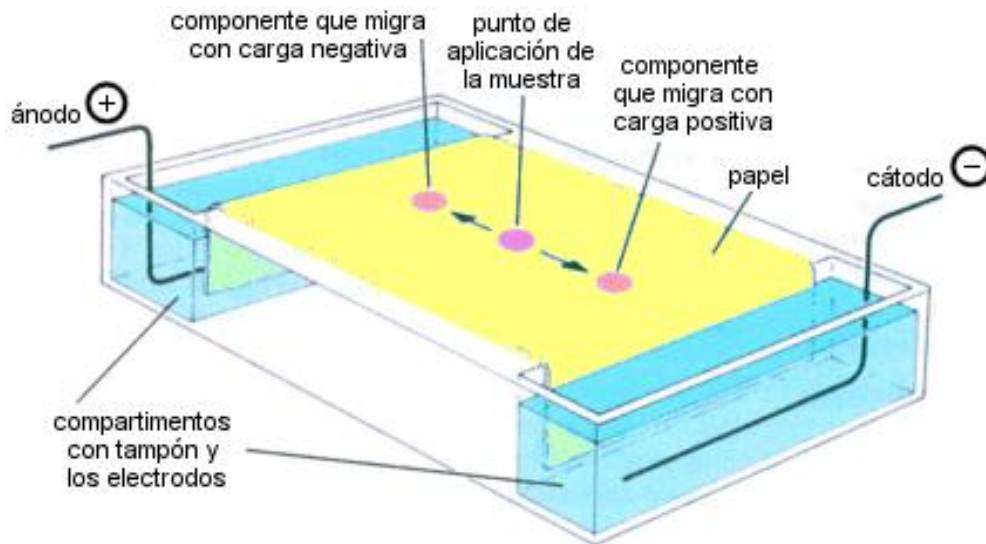
Agarosa+poliacrilamida: porosidad intermedia.

Poliacrilamida con SDS: el dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulphate*) es un detergente aniónico que se une a las proteínas, desnaturalizándolas en una conformación extendida recubierta de moléculas de SDS. Como consecuencia, el tamaño de la molécula de proteína es directamente proporcional a su longitud en aminoácidos y su carga queda enmascarada por la mayor carga del SDS que la recubre, que es también proporcional a la longitud. Por lo tanto, la movilidad electroforética de la proteína depende **exclusivamente** de su masa molecular.



Modos de disposición del soporte.

Horizontal.



En papel, para aminoácidos u otras moléculas pequeñas, y en soportes similares (especialmente, acetato de celulosa), para proteínas.

En gel de almidón o de agarosa, para proteínas y especialmente para ácidos nucleicos. Casi siempre el tampón cubre el gel (para evitar que se seque debido al calentamiento sufrido al pasar la corriente), denominándose por ello "electroforesis *submarina*".

Soporte impregnado de disolución tampón por capilaridad, disuelve la muestra y mantiene el contacto eléctrico.

Se aplica la muestra depositándola (pipeta o aplicador específico) como una gota **sobre** el soporte (papel, acetato de celulosa) o **dentro** de un "pocillo" creado en el gel.

Vertical.

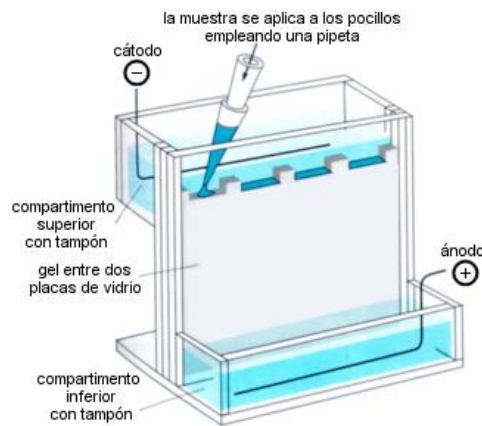
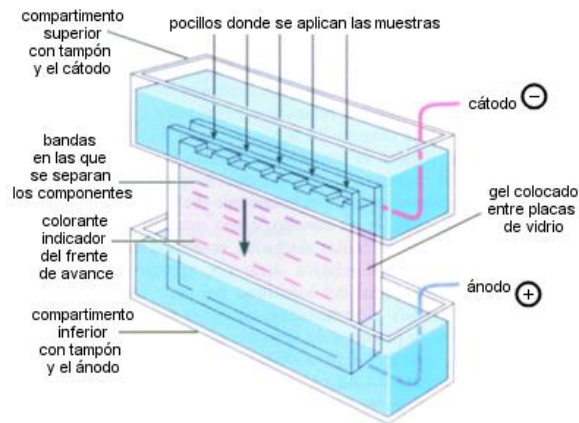
Casi exclusivamente con gel de poliacrilamida (más resistente físicamente, no se desliza), para proteínas o para ácidos nucleicos de pequeño tamaño.

El gel puede rellenar tubos de vidrio (cada vez se usa menos) o estar contenido entre 2 placas rectangulares.

Contacto eléctrico y disolvente gracias al tampón que embebe el gel y llena las cubetas o compartimentos del ánodo y cátodo.

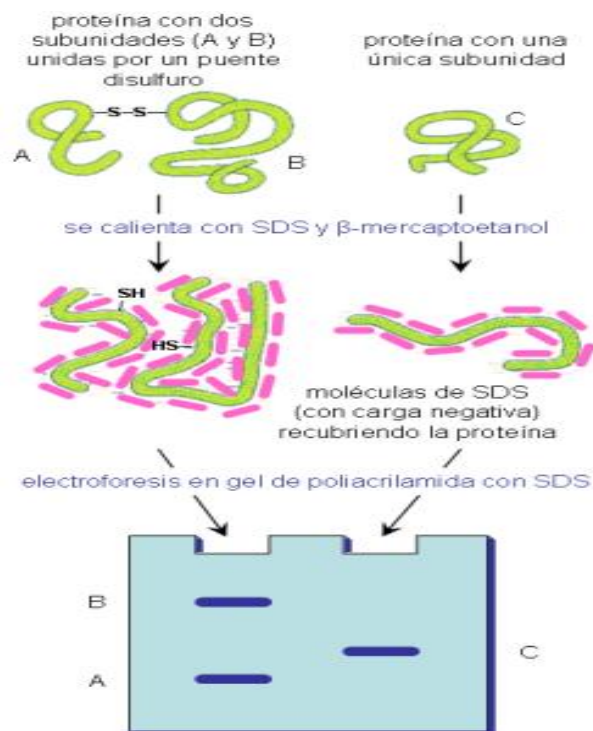
La muestra se deposita con micropipeta llenando un "pocillo" creado al polimerizar el gel.

En cuanto a la composición del gel hay dos variantes: **electroforesis continua** (un solo tipo de gel) y **electroforesis discontinua** (2 tramos de gel de composición ligeramente diferente).



Ejemplos de separación electroforética.

Separación de proteínas por SDS-PAGE discontinua vertical.



SDS-PAGE = *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico.

Gel de poliacrilamida, en placa, vertical.

Separación de acuerdo con la masa molecular (estrictamente, con la longitud de la cadena polipeptídica).

La muestra se trata con SDS (a mayor concentración que en la composición del gel) y se calienta brevemente a 90-100°C, para provocar la desnaturalización. Se suele añadir también β -mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro, separando así las subunidades de la proteína y permitiendo que se extiendan por efecto del SDS.

En la preparación del gel se mezclan:

- un tampón de pH (comúnmente Tris-HCl)
- acrilamida y bisacrilamida
- un agente iniciador de la polimerización, como el persulfato amónico (genera radicales libres)
- un agente catalizador de la polimerización, como el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina)
- SDS

Permite obtener una estimación de la masa molecular de las proteínas separadas. Para ello es preciso analizar en la misma electroforesis unas proteínas patrón, de tamaño conocido, con las que se construye una curva de calibrado, representando movilidad frente a logaritmo de masa molecular.

Para controlar el avance del frente de electroforesis (posición de máxima movilidad) se añade a la muestra un colorante marcador ("*tracking dye*"), molécula cargada y de pequeño tamaño que avanza más que cualquier componente de la muestra; el más habitual es el **azul de bromofenol**.

Para mejorar la resolución (obteniendo **bandas** más compactas) se suele emplear electroforesis **discontinua**:

- En la parte superior, un **gel acumulador o concentrador** (*stacking gel*), que tiene como efecto concentrar la muestra en una banda estrecha.
- Ocupando la mayor parte de la placa, un **gel separador** (*resolving gel*) en el que tiene lugar la separación de los componentes.

El efecto concentrador se debe a una mayor porosidad del gel acumulador combinada con una diferente composición de los tampones de cubeta (Tris-glicina) y de gel (Tris-HCl) y distinto pH para ambos geles.

Nota: "Tris" es tris(hidroximetil)aminometano, una sustancia habitual para preparar disoluciones tampón de pH próximo a 7.

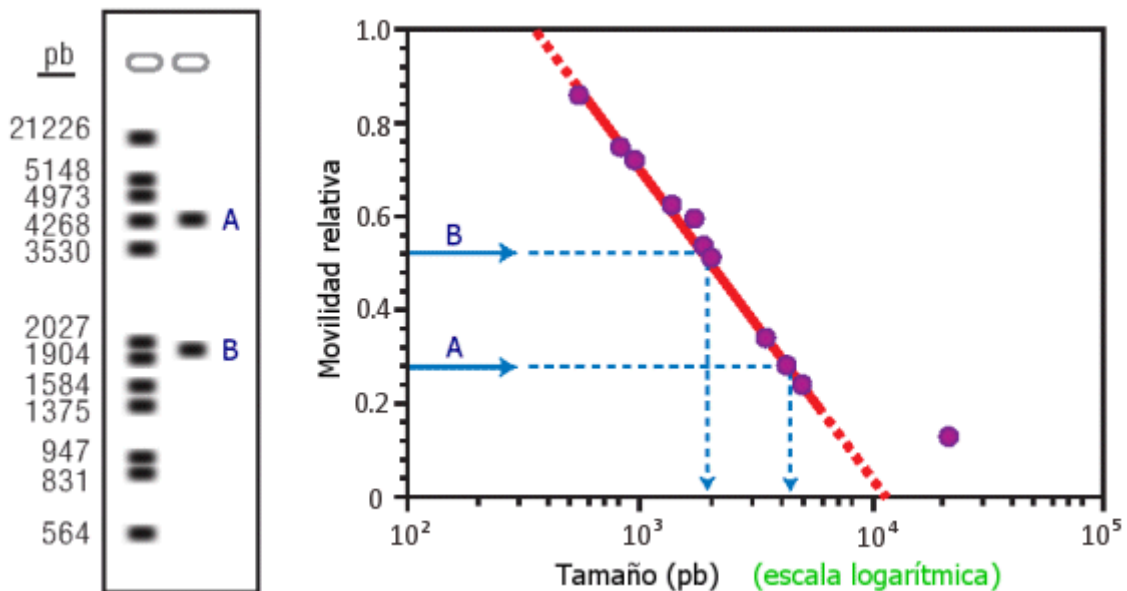
Aplicaciones:

Determinación de la masa molecular.

Como se ha indicado, se puede obtener una estimación de la masa molecular (en kDa) de proteínas empleando SDS-PAGE, y de fragmentos de DNA (en pb) empleando electroforesis en agarosa. En ambos casos, en uno de los pocillos del gel se carga una mezcla de moléculas patrón de tamaño conocido, con el fin de poder trazar la curva de calibrado. Para las proteínas, la validez del dato obtenido depende de que la desnaturalización con SDS haya sido completa y de que se hayan separado las subunidades gracias a la reducción con mercaptoetanol; además, la presencia de oligosacáridos en las glicoproteínas altera la movilidad, que ya no proporciona valores de masa molecular fiables.

Se aplica en uno de los pocillos del gel una mezcla de fragmentos de DNA de tamaño conocido, denominados “patrones”, “marcadores de masa molecular” o “escalera de DNA” (*DNA ladder*). Tras su separación en la electroforesis, se revelan y se representa para todas las bandas la movilidad (distancia avanzada o, mejor, cociente entre ésta y el avance del frente de electroforesis) frente al logaritmo del tamaño (longitud en pb). Sobre la recta ajustada se interpolan las distancias de avance de las muestras problema, calculando así su tamaño en pb.

En este ejemplo, los patrones empleados son fragmentos bien conocidos, aquellos obtenidos a partir del DNA del virus λ por la acción de las endonucleasas de restricción *EcoRI* e *HindIII*.



Determinación del punto isoeléctrico.

Como se ha indicado, mediante isoelectroenfoque se obtiene una medida del punto isoeléctrico de las proteínas (pH_i o pI).

Isoenzimas.

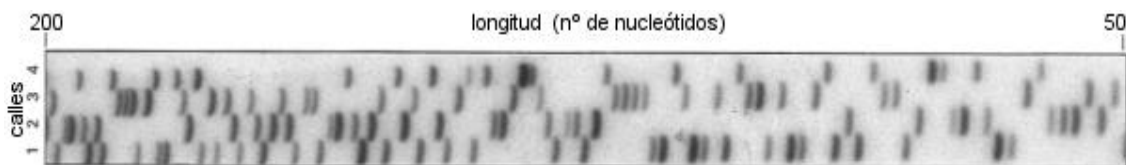
Las variantes de una enzima, con pequeñas diferencias en su estructura y en su actividad enzimática, se analizan rutinariamente mediante electroforesis o, en especial, mediante isoelectroenfoque. De hecho, los nombres de las isoenzimas derivan a veces de su movilidad electroforética. Se puede aplicar análogamente a las **isoformas** de proteínas no enzimáticas.

Mapas de restricción.

Una de las formas de estudiar la secuencia de los ácidos nucleicos, en especial el DNA, consiste en tratarlo con distintas enzimas de restricción, analizar mediante electroforesis en gel de agarosa los fragmentos resultantes e intentar reconstruir la secuencia de la molécula original formando su *mapa de restricción*, uno de los tipos de mapa físico.

Secuenciación de ácidos nucleicos.

La obtención de la secuencia completa, nucleótido a nucleótido, también depende del análisis electroforético de fragmentos de DNA, tanto en el método químico de Maxam y Gilbert como en el método enzimático de Sanger. Se utilizan en este caso geles de poliacrilamida, debido al tamaño pequeño de los fragmentos, pudiéndose resolver fragmentos que se diferencian en un solo nucleótido.



Referencias.

- 1.- <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>
- 2.- J. G. Feinberg and I. Smith. *Paper and thin layer chromatography & electrophoresis*. Longman, (1972).
- 3.- Freifelder David. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Editorial REVERTÉ.

SEGUNDA PARTE:

ENSAYOS FISICO-QUIMICOS DE CONTROL DE CALIDAD.

- 1.- El índice de refracción de sustancias y su utilidad. Refractometría.

- 2.- Sustancias ópticamente activas y poder rotatorio. Polarimetría.

- 3.- Medición del color en alimentos y afines. Colorímetros triestímulos. Espectrocolorímetros. Significado y utilidad coordenadas cromáticas CIE L*,a*,b*. Evaluación de diferencias color. Medida del color en vinos, cafés y mezclas, blancura en harinas, color en pimentones, etc.

- 4.- Caracterización de aceites y grasas por su absorbancia en el UV según normas UNE-EN ISO.

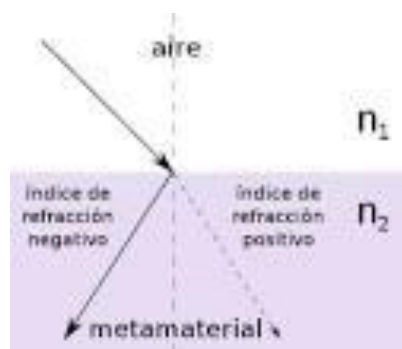
- 5.- Valoraciones o titulaciones de destacada utilidad y mecanismo químico de interés: contenido en H₂O₂ en agua oxigenada, cloro activo en lejías, contenido en tensoactivos aniónicos y catiónicos en detergentes, índice de yodo en grasas y similares, yodometrías y permanganimetrías en general.

- 6.- Otros parámetros físico-químicos de uso frecuente en diversos sectores industriales: medida de densidades o peso específico, viscosimetría con viscosímetros capilares de vidrio y viscosímetros tipo *Brookfield*, puntos de fusión y ebullición, puntos de inflamación, medida de coeficientes de reparto octanol / agua, uso del butirómetro en industria láctea, uso del alcalímetro *Schrödter*, etc.

Práctica TFQ-11. Técnicas físico-químicas. Medida del índice de refracción en líquidos. Aplicación a aceites y disoluciones azucaradas.

Introducción.

El índice de refracción, tal como se determina normalmente, es la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia que se está analizando. Es igual a la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción. El índice de refracción puede determinarse con gran precisión, en ocasiones hasta con cinco cifras significativas y es una de las constantes más importantes empleadas para definir un compuesto y su pureza.



El índice de refracción de una sustancia dada varía con la longitud de onda del rayo de luz empleado y con la temperatura. Salvo indicación contraria el índice de refracción viene referido a la longitud de onda correspondiente a la **línea D (589,3 nm)** del espectro del **sodio**. Se indica con la notación n_D^t donde t indica la temperatura a la que se opera, normalmente 20°C, por ejemplo para el **agua pura** $n_D^{20^\circ\text{C}}$ es **1,33299**. A modo de ejemplo a temperatura de 10°C es de 1,33369 y a 40°C es de 1,33061.

Los índices de refracción se determinan usando refractómetros, de los cuales existen diversos tipos disponibles en el mercado.

Los refractómetros fueron inventados por Dr. Ernst Abbe, científico austriaco-alemán a principios del siglo XX. El refractómetro Abbe que es el que se emplea corrientemente; consiste en una fuente luminosa, un par de prismas móviles y termostatazados, entre los cuales se sitúa la muestra, dos prismas móviles de Amici, los cuales compensan las diferencias en el grado de refracción de la luz a las distintas longitudes de onda, un visor para observar el campo en el que se produce la refracción y una escala para medir el índice de refracción.

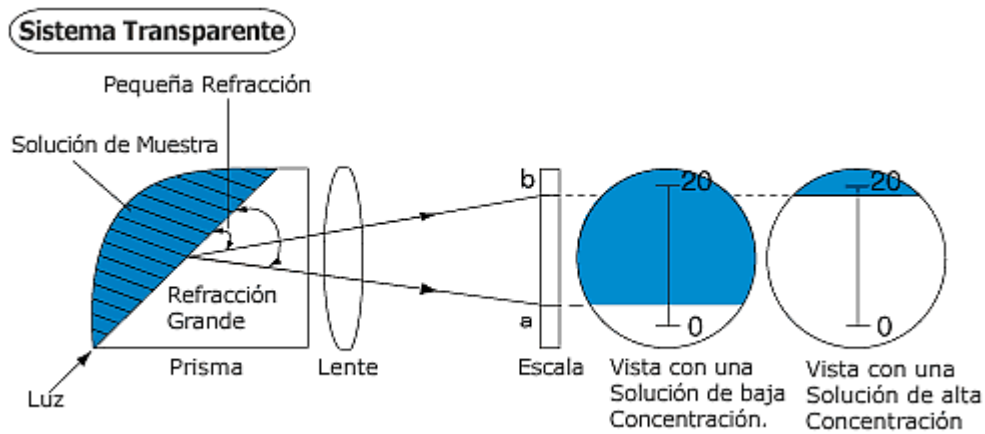


Refractómetro Abbe

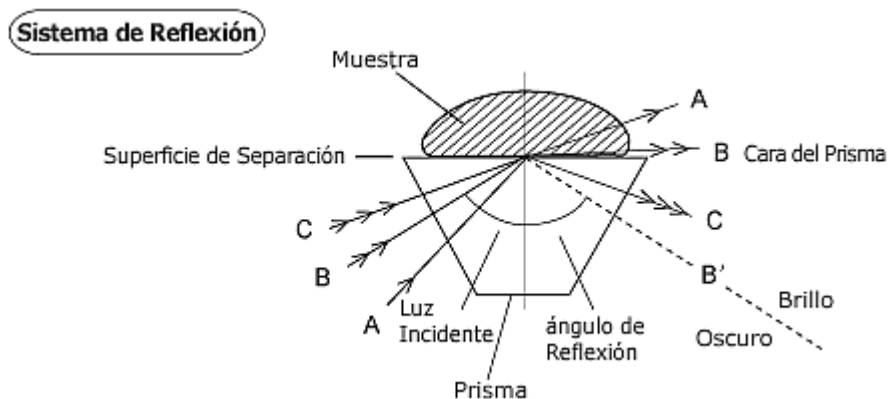
Existen dos tipos de refractómetros en función de la detección del índice de refracción; sistemas transparentes y sistemas de reflexión. Los refractómetros portátiles y los refractómetros Abbe usan los sistemas transparentes, mientras que los refractómetros digitales usan los sistemas de reflexión.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA TRANSPARENTE.

- En la figura de abajo la detección se realiza utilizando el fenómeno refractivo producido en el límite del prisma. El índice de refracción del prisma es mucho más grande que el del ejemplo.
- Si la muestra es de baja concentración, el ángulo de refracción es grande (vea "A") debido a la gran diferencia en el índice de refracción entre el prisma y la muestra.
- Si la muestra es concentrada, el ángulo de refracción es pequeño (vea "B") debido a la pequeña diferencia en el índice de refracción entre el prisma y la muestra.



El sistema de refracción para el refractómetro digital (sistema de reflexión) se detallará más abajo. En la figura siguiente, haz de luz A, que incide desde la parte baja izquierda del prisma, no es reflejada por el límite, pero pasa a través de la muestra. El haz de luz B se refleja por la cara derecha, directamente a lo largo del límite del prisma. El haz de luz C, incide en un ángulo demasiado grande para pasar a través de la muestra, si no que es totalmente reflejado hacia el lado bajo y derecho del prisma. Como resultado, la línea límite es producida dividiendo la luz y la sombra en el otro lado de la línea punteada B en la figura. El ángulo de reflexión de esta línea es proporcional al índice de refracción, la posición de la línea límite entre la luz y los campos oscuros es captada por un sensor y convertidas en índices refractivos.



UNIDAD DE MEDIDA (BRIX).

La Escala de Medición (%) muestra el porcentaje de concentración de los sólidos solubles contenidos en una muestra (solución de agua). El contenido de los sólidos solubles es el total de todos los sólidos disueltos en el agua, incluso el azúcar, las sales, las proteínas, los ácidos, etc., y la medida leída es el total de la suma de éstos. Básicamente, el porcentaje Brix (%) se calibra a la cantidad de gramos de azúcar contenidos en 100 g de solución de azúcar. Así, al medir una solución de azúcar, Brix (%) debe ser perfectamente equivalente a la concentración real. Con soluciones que contienen otros componentes, sobre todo cuando uno quiere saber la concentración exacta, es necesaria una tabla de conversión.

Refracción molar.

Los índices de refracción juntamente con las medidas de densidad y el peso molecular pueden usarse para calcular la denominada refracción molar R_M experimental con la siguiente ecuación:

$$R_M = (n^2 - 1/n^2 + 2) \cdot (M/\rho)$$

Donde M es el peso molecular de la muestra, ρ es la densidad de la muestra y n es el índice de refracción de la misma. Tiene la propiedad de ser aditiva según los distintos grupos constituyentes de una molécula por lo que se pueden estimar índices de refracción de una sustancia. La refracción molar medida puede entonces compararse con la refracción molar obtenida por la suma de las refracciones de los átomos y los grupos presentes en la molécula; esta comparación es muy útil en la identificación de compuestos relativamente inertes, que no se convierten fácilmente en derivados, por ejemplo hidrocarburos, haluros y muchos compuestos que contienen nitrógeno.

Fundamento y objetivos.

Se trata de familiarizarnos con la medida del índice de refracción, su significado, importancia y aplicaciones. Para lo cual vamos a medir índice de refracción de aceites, por ejemplo oliva, girasol, soja, almendras, etc. así como de diversas soluciones azucaradas o almíbares.

Previamente a las mediciones en las muestras problema calibraremos el equipo con sustancias patrón que abarquen un amplio rango de medida teniendo en cuenta y corrigiendo el efecto de la temperatura ambiente, ya que las medidas se refieren normalmente a la temperatura de 20°C. Se buscan los valores tabulados a 20°C en bibliografía y se comparan con los obtenidos experimentalmente. Obtendremos la función de calibrado en su caso. A continuación se miden los índices de refracción de las sustancias problema, se corrigen por efecto de la temperatura y se comparan con los tabulados. Se podrá expresar la concentración de las soluciones azucaradas en °Brix y comprobar la pureza o adulteración de los aceites.

Equipos, materiales y reactivos.

- Refractómetro *Abbe* o equivalente.
- Fuente de luz blanca.
- Sustancias patrón para calibración (por ejemplo: agua desionizada, acetona, tolueno y monobromonaftalina de calidad contrastada).
- Aceites problema para caracterizar.
- Disoluciones azucaradas problema.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Papel *tissu* para limpieza.

Modo de operar.

Previamente a la realización de medidas efectuar un calibrado del refractómetro con cuatro sustancias patrón de índices de refracción estables y perfectamente conocidos, como por ejemplo **agua destilada, acetona PA, tolueno PA y monobromonaftalina** de calidad contrastada. Representar valor obtenido frente a valor “teórico” obtenido en tablas.

La forma de operar con el refractómetro es sencilla; con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico (es importante no rayar las superficies de los prismas de medición) se colocan tres o cuatro gotas de la sustancia a medir sobre la superficie del prisma de medición, se cerrará el prisma de iluminación con precaución, de forma que quede una película de sustancia que cubra toda la superficie y se enfoca hacia una fuente de luz blanca. Gire el mando inferior derecho del refractómetro (mando para ajuste de la línea divisoria de campo) hasta llevar el campo oscuro al centro de la intersección de las líneas diagonales que se muestran en el visor de contraste de campo.

El borde coloreado que aparece en la división entre campo claro y oscuro se hace nítido usando el mando superior correspondiente al compensador; se debe hacer coincidir lo más exactamente posible ese límite de campos con el punto de intersección de las dos diagonales, con ayuda de nuevo con el mando de ajuste de línea divisoria. El índice de refracción se lee en la escala de tres decimales y el cuarto decimal se obtiene por estimación.

Se anota la temperatura del prisma; la variación del índice de refracción con la temperatura depende de los tipos de grupos funcionales presentes en la sustancia, pero puede tomarse como valor aproximado una corrección de 0,00045 por cada grado centígrado de variación; el índice de refracción disminuye cuando aumenta la temperatura.

En la parte inferior de la escala también se puede obtener el °Brix o el tanto por ciento en sustancia azucarada.

Un método estandarizado para la determinación del índice de refracción se puede obtener consultando la norma: **UNE-EN ISO 6320. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de refracción.**

ATENCIÓN: cuando midamos sustancias claras o muy traslúcidas como por ejemplo aceites limpios, sustancias puras transparentes, etc. se puede operar en el refractómetro con luz transmitida pero cuando trabajemos con sustancias muy coloreadas oscuras, turbias (caso de zumos), con materias en suspensión en general, operaremos el refractómetro con luz reflejada desplegando el espejo metálico acoplado al prisma inferior y cerrando la ventana del superior.

NOTA IMPORTANTE: se debe prestar especial cuidado en no rayar los prismas, no añadir excesiva cantidad de sustancia que podría derramarse y manchar el equipo, limpiar las superficies de los prismas absorbiendo con paño suave y etanol, NO FROTANDO. Dejar limpio y seco antes de guardar.

Informe y resultados.

Se deberá aportar gráfica de calibrado, índices de refracción de los aceites, pureza y calidad de los mismos, índices de refracción y grado Brix de las disoluciones azucaradas y discusión de los resultados en su caso.

Aceite	$n_D^{t=25^\circ C}$
linaza	1,4830
algodón	1,4580 - 1,4660 (40°C)
hígado de bacalao	1,4750
almendras	1,4685 – 1,4690
oliva	1,4672 – 1,4677
girasol	1,4740
soja	1,4729
maíz	1,4734
palma	1,4578
de rosa mosqueta refinado	1,4700 -1,4850
de argán	1,4500 – 1,4900
de germen de trigo	≈1,4750
colza	1,4700 – 1,4740

Ejercicio.

Utilizando los datos siguientes: acetato de metilo n_D^{20} : 1,3594 densidad ρ : 0,928 g·cm⁻³ y acetato de propilo n_D^{20} : 1,3844 densidad ρ : 0,887 g·cm⁻³ Determinar la refracción molar de estos compuestos, la refracción molar del acetato de etilo y el índice de refracción del acetato de etilo, si su densidad es 0,900 g·cm⁻³.

Referencias.

- 1.- **Métodos analíticos en alimentación. Métodos Oficiales.** Aceites y grasas. Editado por PANREAC reactivos.
- 2.- Daniel J. Pasto & Carl R. Johnson. Determinación de estructuras orgánicas, Editorial Reverté S.A. 1981
- 3.- <http://www.calibracionjacqueline.blogspot.com.es/2011/11/refractometro-abbe.html>
- 4.- **Handbook of Chemistry and Physics.** CRC Press. 72ND Edition 1991 – 1992.
- 5.- UNE-EN ISO 6320. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de refracción y *Erratum* UNE-EN ISO 6320/2111 AC (2007).
- 6.- <http://campus.usal.es/~quimfis/apoyo/Carmen/Practicas/PracticaRefractometria.PDF>

Tabla 2.1. Refracciones atómicas *

<i>Átomo</i>	<i>Mr_D</i>	<i>Átomo</i>	<i>Mr_D</i>
C, enlace simple aislado	2,592	N, RNHOH	2,48
C, enlace simple	2,418	N, —NH—NH ₂	2,47
C, doble enlace †	1,733	N, RC = N	3,05
C, triple enlace †	2,398	N, ArC ≡ N	3,79
C, conjugado	1,27	N, R ₂ C = NOH	3,93
H	1,100	N, RCONH ₂	2,65
O, hidroxílico	1,525	N, RCONHR	2,27
O, de éter	1,643	N, RCONR ₂	2,71
O, cetónico	2,211	NO, como nitrito	5,91
O, de éster	1,64	NO, como nitrosoamina	5,37
S, como SH	7,69	NO ₂ , como nitrito de alquilo	7,44
S, como RSR	7,97	NO ₂ , como nitrato de alquilo	7,59
S, en —CNS	7,91	NO ₂ , como nitroparafina	6,32
S, como RSSR	8,11	NO ₂ , como nitroaromático	7,30
N, RNH ₂	2,45	NO ₂ , como nitroamino	7,51
N, ArNH ₂	3,21	F	0,95‡
N, R ₂ NH	2,65	Cl	5,967
N, Ar ₂ NH	3,59	Br	8,865
N, R ₃ N	3,00	I	13,900
N, Ar ₃ N	4,36		

* Datos tomados de R. R. Dreisback, "Physical Properties of Organic Compounds", II, *Advances in Chemistry Series*, 22, American Chemical Society, Washington D.C., 1959.
 † Sólo para dobles y triples enlaces.
 ‡ Para el flúor en los compuestos polifluorados el valor es 1.1.

Tabla de índices de refracción de compuestos habituales a 20°C

Compuesto	n_D^{20}	Compuesto	n_D^{20}
agua	1,3330	diclorometano	1,4246
metanol	1,3285	cloroformo	1,4433
etanol	1,3611	ciclohexano	1,4263
Isopropanol(2propanol)	1,3771	dimetilformamida	1,4269
propanol	1,3853	dimetilacetamida	1,4351
butanol	1,3992	formamida	1,4475
ter-butanol	1,3838	benceno	1,5011
alcohol isoamílico	1,4053	tolueno	1,4969
alcohol bencílico	1,5396	o-xileno	1,5054
acetona	1,3588	m-xileno	1,4972
metiletilcetona	1,3785	p-xileno	1,4958
ácido acético	1,3721	piridina	1,5092
acetato de etilo	1,3724	tetracloruro carbono	1,4603
dietileter	1,3526	tricloroetileno	1,4777
diisopropileter	1,3679	percloroetileno	1,5053
acetonitrilo	1,3442	1,1,2- tricloroetano	1,4711
hexano	1,3749	bromobenceno	1,6598
isooctano	1,3935	nitrobenceno	1,5525
nitrometano	1,3935	Sulfuro de carbono	1,6255
tetrahidrofurano	1,4050	benzonitrilo	1,5289
dioxano	1,4224	etilenglicol	1,4318
clorobenceno	1,5248	dietilenglicol	1,4472
N-metilformamida	1,4310	trietilenglicol	1,4568

Práctica TFQ-12. Técnicas físico-químicas. Medida del poder rotatorio de disoluciones azucaradas. Pureza y concentración de sustancias ópticamente activas. Hidrólisis de la sacarosa.

Introducción.

Si se hace pasar un haz de luz polarizada en un plano a través de un medio ópticamente activo se produce un desplazamiento angular del plano de polarización de la luz.

El poder rotatorio define la propiedad que tienen muchas sustancias orgánicas, entre ellas los azúcares, cuando son atravesadas en estado líquido o en disolución por un rayo de luz polarizada, de hacer girar el plano de polarización un cierto ángulo respecto a una determinada posición del mismo plano. La rotación originada puede ser en el sentido de izquierda a derecha o de derecha a izquierda y de aquí la distinción de las sustancias ópticamente activas en *dextrógiras* y *levógiras*, según desvían el plano de luz polarizada hacia la derecha o hacia la izquierda.

Es una técnica de amplio uso sobretodo en la industria azucarera para valorar la riqueza en sacarosa de la remolacha azucarera y de la caña de azúcar principales materias primas de este sector.



Remolacha azucarera

Caña de azúcar

El **poder rotatorio** para una misma sustancia, es proporcional al **espesor** de la capa líquida atravesada por la luz polarizada. Además el ángulo de rotación para una misma sustancia depende:

- 1.- De la **concentración** de la disolución del compuesto ópticamente activo. En algunos casos la rotación es proporcional a la concentración, en cambio en otros casos se aparta más o menos de la proporcionalidad. Es necesario contrastar los intervalos de concentración donde hay linealidad.
- 2.- De la **temperatura**. En función de la naturaleza de la sustancia puede tener una influencia muy pequeña y en otros casos una influencia notable; del mismo modo al aumentar la temperatura en unos casos aumenta y en otros disminuye el poder rotatorio. En todo caso para eliminar esta variación y por convenio se suelen referir las rotaciones a una misma temperatura, normalmente 20°C.
- 3.- De la **longitud de onda** de la radiación empleada. La radiación de longitud de onda menor sufre una rotación mayor y viceversa.

Cuando se trabaja con polarímetros normales y no con espectropolarímetros es necesario fijar un valor de la longitud de onda de ordinario se utiliza la luz amarilla de una lámpara de **vapor de sodio** o emisor correspondiente para la **raya D** de Fraunhofer de valor **589,3 nm**.

4.- De la **naturaleza del disolvente**. Para algunas sustancias ópticamente activas el ángulo de rotación varía con el disolvente empleado.

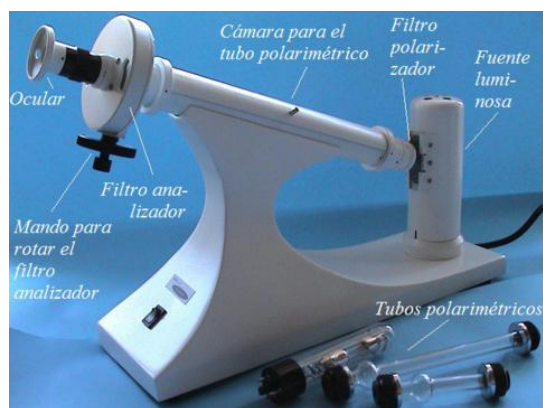
5.- De la **mutarrotación**. La mutarrotación es un fenómeno de isomerización que ocurre en monosacáridos referido a la rotación que sufre el carbono *anomérico* al pasar de un *confórmero* al otro. Puede pasar de un enlace de carbono alfa a uno beta, o viceversa. En la serie "D", por convención si la disposición del OH es hacia arriba lo llamamos beta, si es hacia abajo lo denominamos alfa, ocurriendo lo contrario en la serie "L", donde el OH hacia arriba indica el confórmero alfa, y hacia abajo, el beta.

Para pasar de un estado al otro debe pasar primero por el estado de cadena abierta.

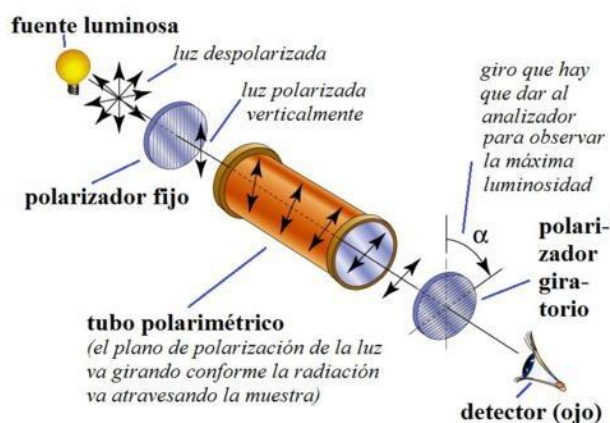
Por tratarse de una rotación del carbono simple carbono anomérico al pasar de un confórmero al otro, se concluye que el compuesto cambia su actividad óptica, variando su valor, pero raramente se invierte. El compuesto original y el resultante son isómeros ópticos entre sí, pero no imágenes especulares.

Por ejemplo ocurre con la glucosa, se estabiliza mediante la adición de unas gotas de hidróxido amónico concentrado.

Cuando se medía la rotación óptica de diferentes disoluciones de D-glucosa se comprobó con sorpresa que en unos casos ésta tenía un valor inicial de +112,2° mientras que en otros este valor era de +18,7°. Resultaba sin embargo todavía más sorprendente que al cabo de unos minutos de haber preparado la disolución la rotación óptica cambiaba para estabilizarse en todos los casos en un valor de +52,7°. El fenómeno de la mutarrotación sugiere que deben existir dos formas estereoisómeras de la D-glucosa con propiedades físicas diferentes.



Polarímetro de tubo



Esquema óptico de un polarímetro.

Los componentes principales de un polarímetro habitual para medir poder rotatorio son una fuente luminosa, un prisma de Nicol para polarizar la luz, un compartimento para ubicar el tubo que contiene la muestra, un prisma de Nicol para analizar, unas lentes de observación y una escala en la cual se indique la rotación óptica de la muestra.

Fundamento y objetivos.

Los carbohidratos o hidratos de carbono están formados por carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) con la fórmula general $(CH_2O)_n$. Los carbohidratos incluyen azúcares, almidones, celulosa, y muchos otros compuestos que se encuentran en los organismos vivos. Los carbohidratos básicos o azúcares simples se denominan *monosacáridos*. Azúcares simples pueden combinarse para formar carbohidratos más complejos. Los carbohidratos con dos azúcares simples se llaman *disacáridos*. Carbohidratos que consisten de dos a diez azúcares simples se llaman *oligosacáridos*, y los que tienen un número mayor se llaman *polisacáridos*.

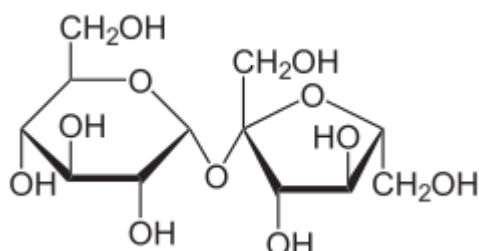
Los azúcares son hidratos de carbonos generalmente blancos y cristalinos, muy solubles en agua y con un sabor dulce.

Estudio de la hidrólisis de la sacarosa.

La **sacarosa, sucrosa o sacarobiosa** es un disacárido que no posee carbonos *anoméricos* libres por lo que carece de poder reductor y la reacción con el licor de Fehling es negativa. Su nombre químico es **alfa-D-Glucopiranosil - (1→2) - beta-D-Fructofuranósido**, mientras que su fórmula es $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Sin embargo, en presencia de HCl y en caliente, la sacarosa se hidroliza, es decir, incorpora una molécula de agua y se descompone en los monosacáridos que la forman, glucosa y fructosa, que sí son reductores.

La prueba de la hidrólisis se realiza con el licor de Fehling y, si el resultado es positivo, aparecerá un precipitado rojo. Si el resultado es negativo, la hidrólisis no se ha realizado correctamente y si en el resultado final aparece una coloración verde en el tubo de ensayo se debe a una hidrólisis parcial de la sacarosa. También se puede estudiar el grado de hidrólisis mediante el uso de la polarimetría como se ha visto.



Sacarosa

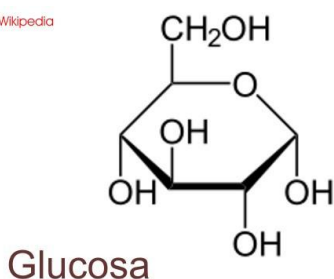
Es el resultado de una reacción química, se produce por la descomposición química de la sacarosa (azúcar común) en dos monosacáridos nuevos (glucosa y fructosa).

De forma natural se encuentra en la naturaleza, por ejemplo la miel o el sirope de savia de arce (*Acer saccharum*). Es el líquido o jarabe resultante del proceso de inversión del azúcar mediante la acción ácida o enzimática, o sea, con una solución de agua, azúcar y ácido cítrico se separan los dos componentes del azúcar, la fructosa y la glucosa.

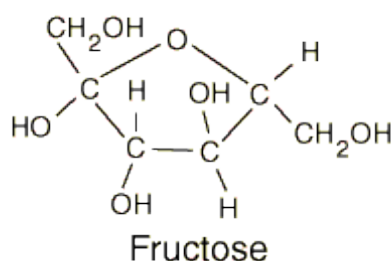
Así se obtiene un líquido ligeramente dorado y espeso con igual contenido de glucosa y fructosa pero que endulza un 30% más que el azúcar, por lo tanto, se aplica en menor cantidad. La fructosa es más dulce que la glucosa, y ambos componentes por separado multiplican el poder edulcorante.

El **azúcar invertido** es un azúcar que se obtiene al dividir la sacarosa en sus dos componentes: glucosa y fructosa, es decir que está constituido por fructosa y glucosa a partes iguales. Su poder endulzante (POD) es más alto que el de la sacarosa y su poder anticongelante (PAC) también.

Wikipedia



Glucosa



Fructose

Su aplicación en heladería es similar a la del uso de la dextrosa, glucosas (jarabe o en polvo), y del jarabe de maíz de alta fructosa.

Hay que tener en cuenta que el poder edulcorante es de un 133%, contra el 100% que posee el azúcar común (sacarosa). Se emplea en bollería, repostería, panadería y heladería, mejorando el producto final al que se le añade.

Como objetivo principal de la práctica, se trata de determinar los poderes rotatorios específicos de varios tipos de azúcares, por ejemplo sacarosa, glucosa, fructosa, manosa y galactosa; y contrastar con los valores tabulados en bibliografía. Así como calcular la concentración en azúcar de un almíbar.

Equipos, materiales y reactivos.

- .- Polarímetro.
- .- Tubos polarimétricos de 1 dm y 2 dm.
- .- Balanza analítica.
- .- Vasos de precipitados de 100 ml
- .- Agitador magnético.
- .- Pipetas, probetas y pipetas Pasteur.
- .- Matraces aforados de 100 ml
- .- Azúcares: sacarosa, fructosa, galactosa, etc.
- .- Hidróxido amónico concentrado.
- .- Sustitutos azúcares tradicionales.
- .- Materias primas de interés: remolacha azucarera, caña de azúcar, etc.

Modo de operar.

Se toman de forma general aproximadamente entre 200 y 500 mg de la muestra purificada en su caso, se pesan cuidadosamente y se disuelven en un volumen adecuado de disolvente y se llevan a matraz aforado enrasando. En el caso de azúcares se suelen pesar unos 10,0 g y se llevan a 100 ml en matraz aforado con agua destilada. Los disolventes normalmente empleados incluyen el agua, metanol, cloroformo y mezclas de agua-etanol. Conviene preparar 2 o 3 muestras patrón con concentraciones en torno al valor de referencia.

Si el poder rotatorio de la muestra es muy bajo se deberán utilizar concentraciones mayores, pudiendo emplearse directamente las muestras líquidas. La disolución de la muestra que debe estar libre de partículas, burbujas y a ser posible ser incolora, se coloca en el tubo del polarímetro, que pueden ser de 10 cm y 20 cm. Se debe prestar especial cuidado al llenar el tubo ya que no debe quedar ninguna burbuja de aire y en todo caso mínima y en la parte superior del abultamiento del que dispone el tubo. Para facilitar la operación de llenado existen comercialmente tubos con embudo de llenado lateral. Para distinguir nítidamente los tres semi-campos del visor-analizador se debe operar en condiciones de semioscuridad.

El blanco o punto cero del polarímetro se establece bien en el aire o bien con el tubo lleno de agua destilada, antes de realizar cualquier medición, observando el campo luminoso a través del ocular; si la orientación de los dos prismas de Nicol, no es la misma, el campo luminoso aparecerá dividido en dos partes, una oscura y otra clara, dependiendo del desplazamiento angular relativo del 0°.

Se ajusta la lente de observación hasta obtener la máxima diferenciación entre los dos campos, ajustando a continuación el prisma móvil hasta que no sea posible distinguir contraste alguno entre las dos mitades del campo luminoso, se lee la rotación óptica sobre la escala situada encima del prisma móvil, que deberá coincidir exactamente con 0º, caso que no sea así será necesario corregir las medidas con el error de cero. Esta escala está normalmente dividida en divisiones de 0,25º, con un nonius capaz de apreciar aprox. 0,01º.

Para obtener la medida de la rotación para una muestra problema se realizarán tres lecturas de la misma a ser posible por observadores distintos, a fin de obtener un valor promedio.

En función de que la muestra sea **destrógira (+)** o **levógira (-)** el contraste de campo aparecerá colocado en un sentido o en el opuesto; en función de en qué sentido se desvíe el rayo de luz polarizada moveremos el mando del prisma móvil en el sentido de ángulos crecientes o en el sentido de ángulo decreciente, hasta anular el contraste de campo, leer en la escala la rotación hasta la centésima de grado y poner su signo.

La rotación específica (α) se calcula con la ecuación:

$$[\alpha]_D^T = \alpha \cdot 100 / l \cdot c \quad (\text{Ley de Biot sacarímetros})$$

Donde α es la rotación observada en el polarímetro, l es la longitud del tubo que contiene la muestra en $[dm]$, c son los gramos de soluto disueltos en 100 ml de disolución, T es la temperatura a la que se realizó la medición y D es la longitud de onda correspondiente a la línea D del espectro del sodio.

El disolvente empleado debe especificarse al igual que la concentración; por lo cual la rotación de la muestra se presentará de la siguiente forma:

$$[\alpha]_D^{20^\circ C} +65,2 (c 1,0 H_2O).$$

Debiendo determinarse empleando por lo menos dos muestras distintas con concentraciones diferentes del soluto, puesto que en ciertas ocasiones las muestras pueden poseer unos coeficientes específicos de rotación muy elevados, no distinguiéndose con una sola medida, Por ejemplo una rotación específica positiva fuerte y una rotación específica negativa moderada. Las rotaciones específicas sólo pueden compararse si se usa el mismo disolvente.

Informe y resultados.

Indicar rotaciones específicas para los azúcares medidos y riqueza en azúcar del almíbar medido. Contrastar mediante *Handbook of Chemistry and Physics* o similar de que azúcares se trata.

Como optativo comprobar el poder rotatorio de otros edulcorantes por ejemplo sacarina, sucralosa*, ciclamato, aspartamo, acesulfamo k, estevia, fruta del monje (*Nectresse*), azúcar de caña, panela, etc.

Ejercicios.

1.- La rotación óptica específica de sacarosa, glucosa y fructosa en disolución acuosa es: $+66,5^\circ$ $+52,7^\circ$ y $-92,4^\circ$ a 20°C y 589 nm . Determinar la rotación óptica de una disolución acuosa de sacarosa de concentración $10,0\text{ g/cl}$ contenida en un tubo de 10 cm . Si a la disolución anterior se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado se produce la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa. Al cabo de cierto tiempo la rotación óptica de esta disolución es de $+18,6^\circ$. Determinar la fracción de sacarosa que se ha hidrolizado.

2.- Para el aminoácido L-lisina, en disolución acuosa a 25°C , se han medido los valores siguientes de rotación óptica, en tubo de 10 cm y longitud de onda de 589 nm :

C (g/cL)	7,4	14,8	22,2	29,6
α (grados)	1,05	2,00	3,05	3,95

Determinar la rotación óptica específica. Una disolución de concentración desconocida produce en las mismas condiciones una rotación óptica de $2,45^\circ$, determinar su concentración.

(*) La sucralosa se fabrica por halogenación selectiva de sacarosa, reemplazando los tres grupos hidroxilo de la molécula por cloro para obtener 4-cloro-4-desoxi- α -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- β -D-fructofuranosilo o $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{O}_8$. A diferencia del aspartamo, es termoestable y resiste las variaciones del pH; puede usarse en pastelería o en productos de larga vida.

Tabla comparativa de poder edulcorante de azúcares frecuentes:

Edulcorante	Grado de dulzura	PE relativo a la sacarosa (azúcar común)
Sacarosa	100	-
Fructosa	173.3	1,73
Glucosa	74,3	0.74
Lactosa	16	0.16
Maltosa	32	0.32
Galactosa	32	0.32
Sacarina	30.000-40.000	300 o 400
Ciclamato de sodio	5.000 - 10.000	50-100
Aspartame	15000 - 2000	150-200
Neotame	700.000 – 1.300.000	7000 a 13000
Acesulfame k	20.000	200
Taumatina	250.000	2500
DHC de la neohesperidina	25.000 – 200.000	250 y 2000
Sucralosa	60.000	600
Estivosido	35.000 – 40.000	350-400

Neotame E961. Edulcorante sintético bajo en calorías y potenciador del sabor. Es hasta 13.000 veces más dulce que el azúcar.

Referencias.

- 1.- <http://bioquimicamarzo-julio.blogspot.com.es/2014/06/prueba-de-hidrolisis-de-la-sacarosa-1.html>
- 2.- Alonso Felipe, J.V. **PROYECTO FIN DE CARRERA.** *Planta piloto productora de azúcar a partir de remolacha azucarera.* E.U. Ingeniería Técnica Industrial, Universidad de Valladolid (España) 1981.
- 3.- <http://www.bionova.org.es/biocast/tema07.htm>
- 4.- Daniel J. Pasto & Carl R. Johnson. *Determinación de estructuras orgánicas,* Editorial Reverté S.A. (1981).
- 5.- **Handbook of Chemistry and Physics.** CRC Press. 72ND Edition 1991 – 1992.
- 6.- <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEIFukEIEhvYLbrsd.php>
- 7.- <http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e961-edulcorante-neotamo.html>

Práctica TFQ-13. Técnicas físico-químicas. Control del color en productos alimenticios: Medida del color en vinos, en mezclas de distintos tipos de café, medida del color en pimentón molido y determinación del grado de blancura en harinas.

Introducción.

El color del vino viene dado por el color de la piel de la uva con la que se haya elaborado, así, un vino blanco proviene de las uvas verdes o blancas, un vino rosado se obtendría dejando macerar brevemente el mosto con la piel de la uva y un vino tinto se obtendría dejando macerar el mosto con la piel de la uva hasta alcanzar el color deseado por el enólogo.

Pero no es de la elaboración de los vinos de lo que queremos hablar, sino del color del vino en su etapa de guarda en una bodega particular. El tiempo cambia el color del vino, o sea, el proceso de guarda provoca en los vinos cambios significativos en su color, los vinos tintos terminan aclarándose y los vinos blancos se oscurecen, por eso, excederse en los tiempos de guarda resultaría un inconveniente.



Los vinos deben guardarse evitando que se conviertan en vinos muertos, un vino de guarda es complejo y reúne todas las características necesarias para este proceso, aromas, textura, grado alcohólico, tipo de botella, factores que nos permitirán mantener nuestros vinos durante un determinado periodo de tiempo en nuestra bodega particular. Pero dejar madurar demasiado un vino provoca que termine apagándose y se convierta en un vino muerto, y en este caso, el color nos puede decir mucho sobre el vino.

Un vino envejece paulatinamente, poco a poco pierde sus aromas frutales y son sustituidos por aromas mucho más complejos, excedernos en la guarda provoca que el proceso finalice y termine perdiéndose la estructura, el vino ya no mejora y comienza a degradarse. El color del vino puede variar desde un púrpura oscuro, pasando por distintas tonalidades de rojo, hasta llegar a un color similar al de una teja de color claro.

En un proceso de guarda prolongado el color del vino se apaga perdiendo su brillo y su intensidad, el rojo vivo que lo caracterizaba cuando era joven ha desaparecido, al igual que los complejos aromas terciarios. Con los vinos blancos ocurre lo mismo y quizás son más fácilmente detectables, de hecho, no hace falta que pase mucho tiempo para que empiecen a oscurecerse.

Disfrutar de un buen vino en toda su plenitud pasa por no excederse en el tiempo de guarda, de lo contrario, el vino termina “muriendo” acabando su maduración y comenzando el proceso de degradación.

Es mejor disfrutarlos antes y no debemos llegar al límite, recordemos que el proceso de guarda para un vino de crianza sería de unos cuatro años a partir de la añada, ocho años para un vino reserva y quince años para un gran reserva. De este modo nos aseguraremos de poder disfrutar de todo el esplendor en aromas, textura, sabor y por supuesto, color.

Con el paso del tiempo los vinos tintos tienden a aclararse y los blancos adquieren una tonalidad más oscura. El tono de los vinos tintos pasa de rojo rubí, al inicio de su envejecimiento, pasando por una variedad de rojos hasta obtener una coloración teja claro. En los blancos el color pasa de unos reflejos verdosos y dorados, prácticamente incoloro, a un color intenso de amarillo oro con el paso del tiempo.

La explicación de los cambios de color se debe a que los **antocianos** (moléculas responsables del color en los vinos), y los **taninos** (responsables de la astringencia y el cuerpo de los vinos), participan simultáneamente en la coloración rojo vivo de los vinos jóvenes, al curso de su conservación, los antocianos libres desaparecen y los complejos taninos-antocianos condensados confieren a los vinos viejos su matiz de tela de cebolla tan característico.

Para que se realice esta transformación es necesaria la presencia de oxígeno. Para que la duración del color rojo vivo se alargue y se conserve con el tiempo es necesario que en la asociación taninos-antocianos tenga una relación 2:1, es decir, dos taninos por cada antociano, y esto se debe conseguir en la maceración de los hollejos.

Los posos que se forman en las botellas de vinos viejos son consecuencia de que las moléculas de la materia colorante tienden a polimerizarse, formando moléculas más gruesas. De este modo, pasan de estado soluble al estado coloidal, y por último al insoluble. Siendo este fenómeno totalmente ajeno al oxígeno. A mayor temperatura este proceso se acelera, por ejemplo, en verano o en lugares no adecuados para el reposo de los vinos en botella.

SISTEMAS DE COORDENADAS PARA MEDIDA DEL COLOR.

Espacio de color Hunter Lab. El espacio de Hunter Lab fue desarrollado en 1948 por R. S. Hunter como un espacio de color uniforme que podía leerse directamente de un colorímetro fotoeléctrico (método triestímulo). Los valores de este espacio se definen mediante las fórmulas siguientes:

$$L = 100 \left(\frac{Y}{Y_0} \right)^{1/2}$$

$$a = 175 \left[\frac{0.0102 X_0}{(Y/Y_0)} \right]^{1/2} \cdot \left[\left(\frac{X}{X_0} \right) - \left(\frac{Y}{Y_0} \right) \right]$$

$$b = 70 \left[\frac{0.00847 Z_0}{(Y/Y_0)} \right]^{1/2} \cdot \left[\left(\frac{Y}{Y_0} \right) - \left(\frac{Z}{Z_0} \right) \right]$$

Donde

X, Y, Z: valores triestímulos del espécimen (también pueden utilizarse valores triestímulos X_{10} , Y_{10} , Z_{10}).

X_0 , Y_0 , Z_0 : valores triestímulos del difusor reflectante perfecto.

Para el Observador estándar de 2° y el Iluminante estándar C, las ecuaciones anteriores se convertirían en:

$$L = 10 Y^{1/2}$$

$$a = \frac{17.5 (1.02X - Y)}{Y^{1/2}}$$

$$b = \frac{7.0 (Y - 0.847Z)}{Y^{1/2}}$$

La diferencia de color ΔE_H en el espacio de color de Hunter Lab, que indica el grado de diferencia de color pero no la dirección, se define mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E_H = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

El sistema de color de Munsell consiste en una serie de diagramas de colores concebidos para su uso a efectos de comparación visual con el espécimen. Los colores se definen en términos de **Tono de Munsell** (H; indica tono), **Valor de Munsell** (V, indica luminosidad) y **Croma de Munsell** (C, indica saturación) y se escriben como H V/C.

Por ejemplo, para el color con H=5,0R, V=4,0 y C=14,0, la anotación de Munsell sería: 5,0R 4,0/14,0

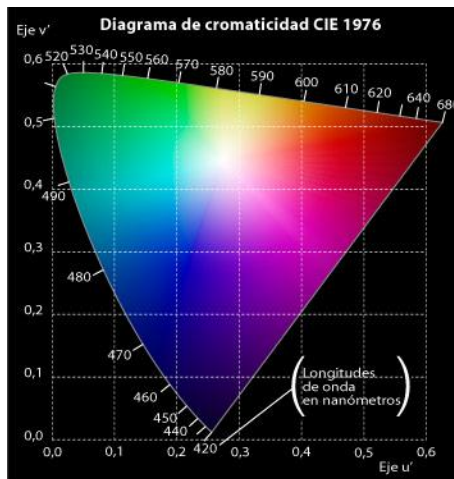
FUENTE: <http://www.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/learning-centre/colour-measurement/precise-colour-communication.html>

El espacio de color CIE $L^*a^*b^*$

Hay dos problemas especialmente obvios en la especificación de colores en términos de valores triestímulos y espacio cromático.

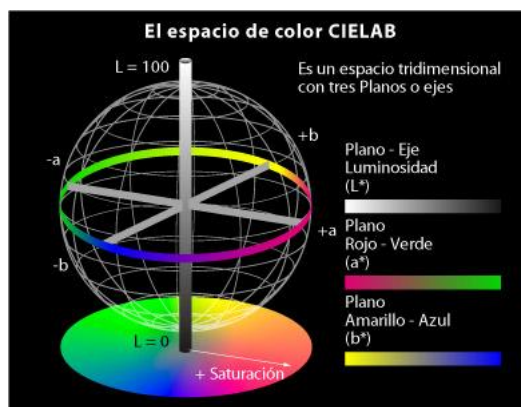
1. Esa especificación de los colores no es fácilmente interpretable en términos de dimensiones psicofísicas de percepción del color; es decir, brillo, tono y coloración.
2. El sistema XYZ y los diagramas de cromaticidad asociados no son perceptualmente uniformes.

El segundo problema dificulta el cálculo de las diferencias entre dos estímulos de color. La necesidad de un espacio de color uniforme condujo a la transformación de una serie de transformaciones no lineales del espacio CIE XYZ 1931 que concluyeron en la especificación concreta de una de estas transformaciones en lo que se conoce como espacio de color CIE 1976 ($L^*a^*b^*$).



De hecho, en 1976, CIE especificó dos espacios de color. Uno era para colores emitidos (*self-luminous*) y otro para colores en superficies. Las notas que ves aquí tratan sobre todo de este último, al que conocemos como espacio de color CIE 1976 ($L^*a^*b^*$) o CIELAB.

El espacio CIELAB permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional. El eje *L es el de luminosidad (*lightness*) y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son a^* y b^* , y representan variación entre rojizo-verdoso, y amarillento-azulado, respectivamente. Aquellos casos en los que $a^* = b^* = 0$ son acromáticos; por eso el eje *L representa la escala acromática de grises que va del blanco al negro.



Las proporciones de L^* , a^* y b^* se obtienen de los valores triestímulos de acuerdo con las siguientes transformaciones:

$$L^* = 116\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} - 16$$

$$a^* = 500\left[\left(\frac{X}{X_n}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}}\right]$$

$$b^* = 200\left[\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Z}{Z_n}\right)^{\frac{1}{3}}\right]$$

$$L^* = 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16, Y_n^{1/3}$$

$$a^* = 500[(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}]$$

$$b^* = 200[(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}]$$

Donde X_n , Y_n , and Z_n son los respectivos valores de X, Y y Z con el iluminante que se haya usado para obtener los valores X, Y y Z de la muestra; y los cocientes de X/X_n , Y/Y_n y Z/Z_n son todos superiores a 0,008856 (cuando alguno de ellos es menor a esa cifra, se usa un conjunto de ecuaciones levemente distinto). Fuente: [Stephen Westland](#)

Fundamento y objetivos.

El conocimiento del color de un vino es un parámetro muy práctico para comprobar la evolución de la materia colorante en el transcurso de la crianza del mismo.

El color de los vinos se puede determinar visualmente mediante una determinada iluminación, pero es posible realizarlo de forma más objetiva independiente del observador y reproducible como es mediante un colorímetro triestímulos o un espectrocolorímetro. Este método es independiente de la percepción organoléptica del individuo y por tanto más exacto.

En este procedimiento mediremos el color del vino por transmisión a unas determinadas longitudes de onda empleando el espectrofotómetro.

Para ello usaremos el método de de Hardy, basado en el sistema de coordenadas CIE con relación a la luz de día nublado (Iluminante C).

El color de un vino, licor o bebida en general, queda completamente definido por la luminosidad relativa Y , en tanto por ciento y las coordenadas cromáticas x , y . de esta manera es posible prever las características cromáticas de una mezcla de vinos cuando se conocen las coordenadas cromáticas de los vinos individualmente.

Equipos, materiales y reactivos.

- .- Espectrofotómetro vis-UV
- .- Cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico
- .- Papel de filtro
- .- Algodón en borra
- .- Centrífuga
- .- Agua destilada
- .- Pipetas Pasteur

Modo de operar.

En el momento de medir el color el vino debe estar limpio, sin burbujas, materia en suspensión, etc. En caso de que no fuera así, deberemos eliminar los residuos bien por filtración normal o bien por centrifugación. Si se trata de un vino con aguja o espumoso, deberemos eliminar el gas carbónico por filtración a través de algodón o bien agitando de vez en cuando y dejando reposar durante una hora.

Medir en cubeta de 1 cm y frente a un blanco de referencia las transmitancias del vino problema a las cuatro longitudes de onda características siguientes: **625 nm, 550 nm, 495 nm y 445 nm**. En caso que la absorción del vino sea especialmente intensa será necesario utilizar cubetas de menor paso óptico.

Se procede a calcular las coordenadas (x, y) del punto representativo del color del vino en el diagrama tricromático CIE.

$$x = X/X+Y+Z$$

$$y = Y/X+Y+Z$$

donde:

$$X = 0,42 T_{625} + 0,35 T_{550} + 0,21 T_{445}$$

$$Y = 0,20 T_{625} + 0,63 T_{550} + 0,17 T_{495}$$

$$Z = 0,24 T_{495} + 0,94 T_{445}$$

Los valores triestímulos X, Y, Z expresan las proporciones de colores rojos, amarillo-verdosos y azules que dan por mezcla el color del vino.

Representar el punto obtenido en el diagrama de cromaticidad CIE, igualmente para el resto de vinos que se midan o en su caso para un mismo vino en función de su periodo de envejecimiento.

Veamos en qué consisten los diversos parámetros que explican el color de un vino. La **luminosidad relativa** está representada por el valor de Y, en porcentaje, variando entre el valor 0 (negro perfecto) y el valor 100 (incolore).

La cromaticidad (longitud de onda dominante y pureza cromática). Para su determinación se recurre al diagrama de cromaticidad CIE, que representa el lugar geométrico de todos los colores del espectro, considerando que a 400 nm corresponde al azul, a 520 nm corresponde al verde y a 700 nm corresponde al rojo. El punto O, corresponde a la fuente luminosa utilizada, que en este caso, es el iluminante estándar Q, que representa la luz de un día medianamente claro y cuyas coordenadas son: $x_o = 0,3525$ e $y_o = 0,3163$.

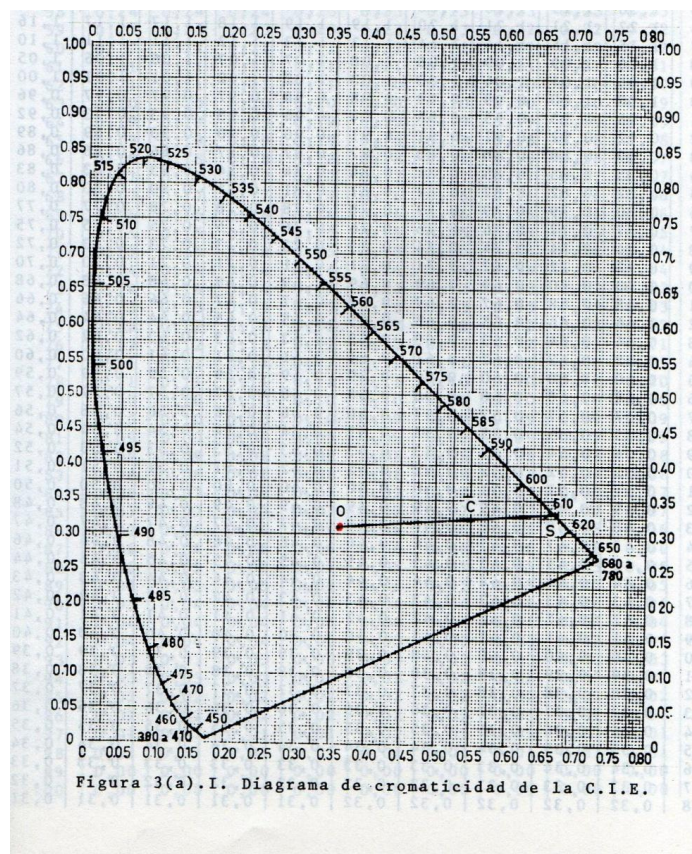


Diagrama cromático (x, y, Y)

Longitud de onda dominante.

Conocidas las coordenadas (x, y) del punto del color del vino se une con el punto O hasta cortar a la línea periférica del lugar de los colores espectrales puros, esa longitud de onda es el matiz de ese color.

Así en el caso de vinos de *tono teja*, la longitud de onda dominante se sitúa entre 585 y 598 nm aproximadamente. Para los vinos de un color *tinto franco*, se sitúa entre 599 y 650 nm, mientras que para los vinos de *tono púrpura* la longitud de onda dominante es la caracterizada por el color complementario. Este color complementario en el caso de vinos de tono rojo púrpura se sitúa en el verde. Se anota el color de esta longitud de onda seguido de la letra *c* (complementario).

Pureza cromática.

La pureza de color se calcula determinando la distancia relativa del punto que corresponde al color del vino C con respecto al punto de corte en la línea de longitudes de onda S y al punto O que representa como se ha dicho el iluminante.

$$\% \text{ PUREZA} = (OC / OS) \cdot 100$$

Aplicar este procedimiento a la medida de distintos tipos de vinos y otras bebidas espirituosas.

Intensidad colorante y tonalidad.

Para el caso de vinos tintos y rosados existe un método que por su sencillez y rapidez es muy práctico para comprobar la evolución de la materia colorante durante su crianza o añejamiento. Con este método no se definen exactamente las coordenadas cromáticas, sino la intensidad y tonalidad del color, que son características cromáticas convencionales.

La intensidad de color se cuantifica por la suma de las absorbancias del vino para un espesor de 1 cm correspondiente a las longitudes de onda de absorbancia (420 nm y 520 nm) del vino tinto.

La tonalidad se expresa por el ángulo que forma con el eje de longitudes de onda la cuerda que une los puntos de la curva espectrofotométrica representativos de las absorbancias correspondientes a las longitudes de onda de 420 y 520 nm.

La intensidad colorante viene dada por la expresión:

$$I = (A_{420} + A_{520}) \cdot 1/b$$

b: espesor en cm de la cubeta utilizada.

La tonalidad se mide por el ángulo cuya tangente es igual a la diferencia del valor numérico de las dos absorbancias a 520 y 420 nm, es decir:

$$T = \text{arc tan } (A_{520} - A_{420})$$

Índice de blancura.

Ésta es una medida de amplio uso en la industria textil y del papel y se ha extendido a la de medicamentos, plásticos, cerámica y alimentos. Una superficie blanca ideal debe tener un índice de blancura (IW) igual a 100; cuando la diferencia entre el blanco ideal y el de la superficie que se evalúa se incrementa entonces IW disminuye.

El cálculo para determinar el indicador de blancura más indicado, de acuerdo a los datos obtenidos de factores **L**, **a** y **b** del sistema Hunter, son los siguientes:

$$IW = L - 3b + 3a \text{ Hunter (1960) Ecuación 1}$$

$$IW = 92.014 - 3(9.78) + 3(0.56)$$

$$IW = 64.35$$

$$IW = 100 - ((100/L)^2 + (10b^2))^{1/2} \text{ Hunter (1960) Ecuación 2}$$

$$IW = 100 - ((100/92.014)^2 + (10 \cdot 9.78^2))^{1/2}$$

$$IW = 69.06$$

Para iluminante C. donde: L, a y b son coordenadas cromáticas del sistema CIE Lab. Los valores obtenidos por medio de las ecuaciones anteriores dieron valores muy similares de 64,35 y 69,06, lo que indica que la harina de trigo no tiene un color blanco ideal, la cual indica que las harinas analizadas por ellos presentan un color blanco amarillento.

La determinación del índice de blancura de la harina comercial se realizó con un colorímetro *HunterLab Color Quest XE* calibrado con un estándar blanco en forma de placa (L = 97,79, a = -0,53 y b = +2,28), leyendo con un iluminante tipo C, obteniendo los factores **a**, **b** y **L** del sistema Hunter (4).

Informe, resultados y discusión.

- 1.- Calcular y representar los colores de los vinos medidos en diversos sistemas de coordenadas.
- 2.- Calcular longitud de onda dominante y pureza cromática para un vino joven y otro añejo.
- 3.- Medir índice de blancura en diversos tipos de harinas.
- 4.- Medir en diversos sistemas de coordenadas el color de pimentón dulce, picante del tipo de la Vera y otro pimentón de secado al sol (tipo Murcia). Ver diferencias.
- 5.- Partiendo de café natural 100% y café torrefacto 100%, realizar mezclas p.e. 30/70, 40/60, 50/50, 60/40 y 70/30, obtener coordenadas cromáticas CIE L*a*b*, realizar curva de calibrado y analizar mezcla desconocida.

EJEMPLO DE DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS: “Las muestras de harina presentaron tonos amarillo claro, presentando valores positivos de **b** comprendidos entre 9,77 y 9,79; es decir, que tendieron al amarillo. Acusaron valores de **a** positivos, entre 0,52 y 0,58 por lo que se encontró dentro de la zona de los tonos rojizos. Éstas muestras presentaron valores de **a/b** bajos: 0.057; demostrándose que la harina de trigo no tiene un color blanco ideal. Los valores de **C*** y de **H*** permiten interpretar que no hay diferencia cualitativa de color entre las muestras; así, en el eje del rojo-verde **a***, una muestra con mayor valor **a*** no se percibe necesariamente como más rojo, lo que ocurre con la harina de trigo, que otra con menor valor **a***. El uso de **C*a b** y **H*a b** permite entonces una representación más intuitiva del color.”

Ejercicios.

1.- El índice de blancura CIE se define como $WI = Y + 800(x_n - x) + 1700(y_n - y)$, siendo x_n , y_n las cromaticidades del iluminante D65, los parámetros (x, y, Y) son los valores colorimétricos del objeto blanco a medir.

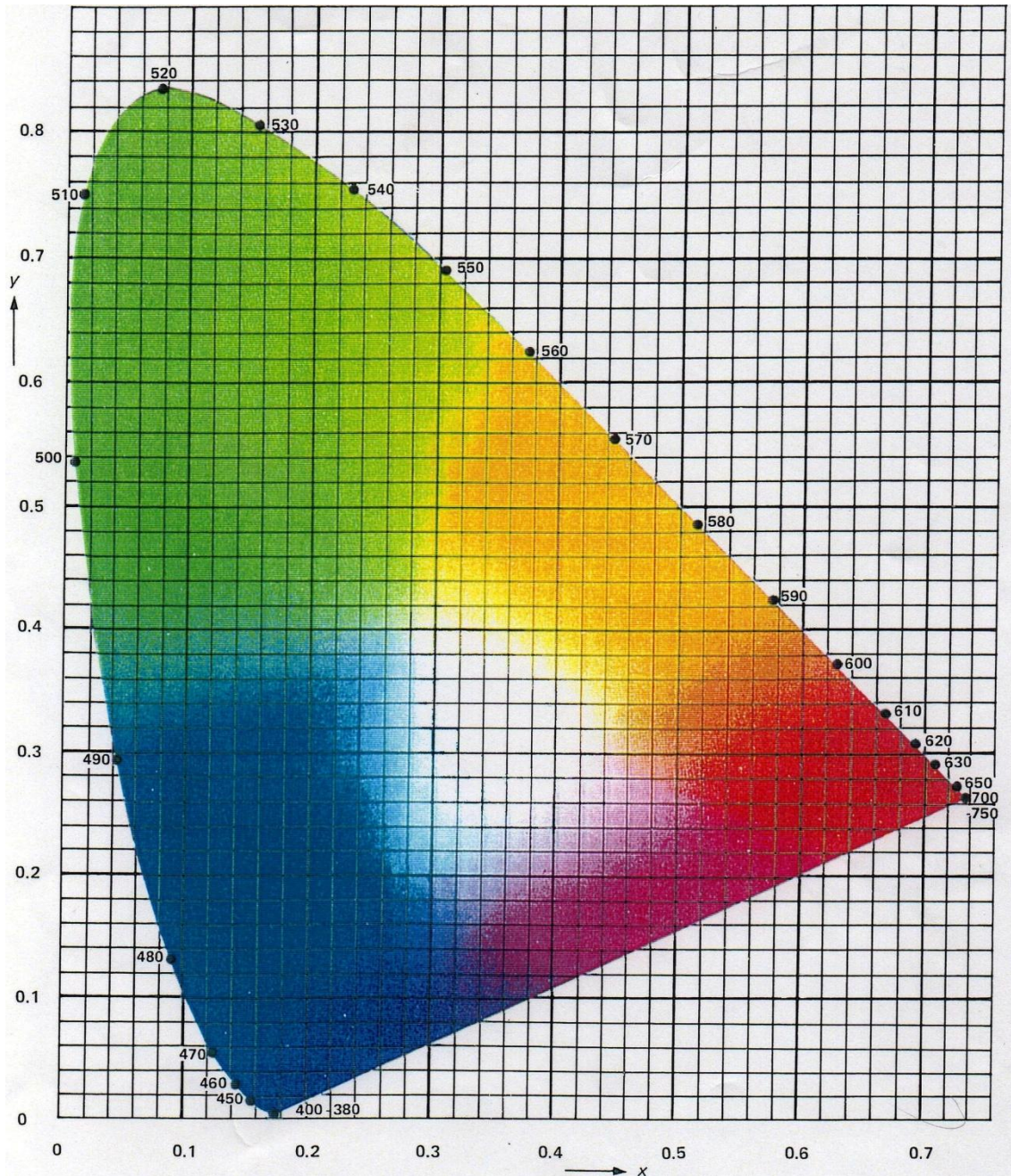
Por otra parte, el grado de matiz del blanco se mide a través de la fórmula

$TW = 1000(x_n - x) - 650(y_n - y)$, con matiz verdoso si $TW > 0$ y matiz rojizo si $TW < 0$.
Calcula, pues, como ejemplo el índice de blancura y el grado de matiz de una muestra blanca tal que $x = 0.332$, $y = 0.323$, $Y = 98$ bajo iluminante D65.

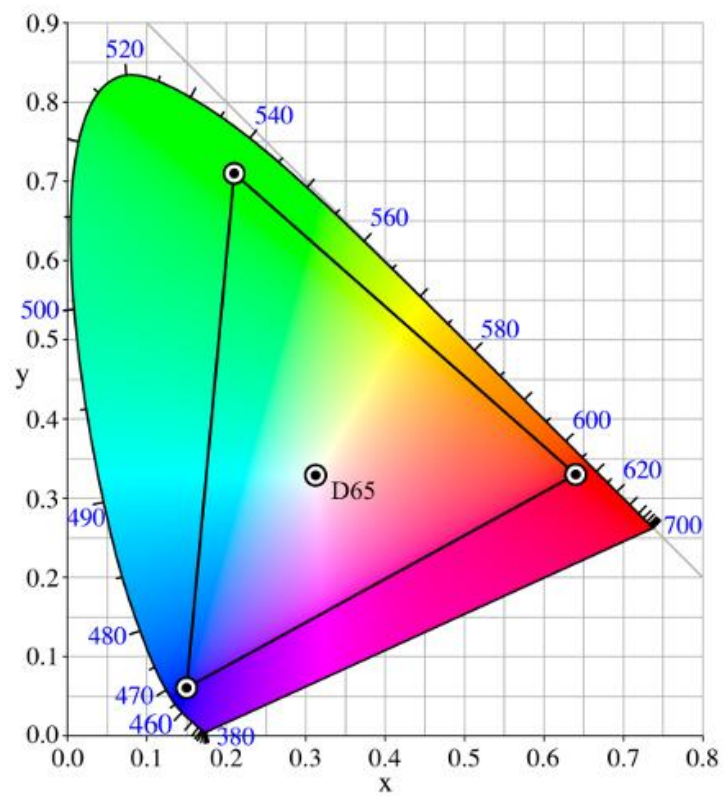
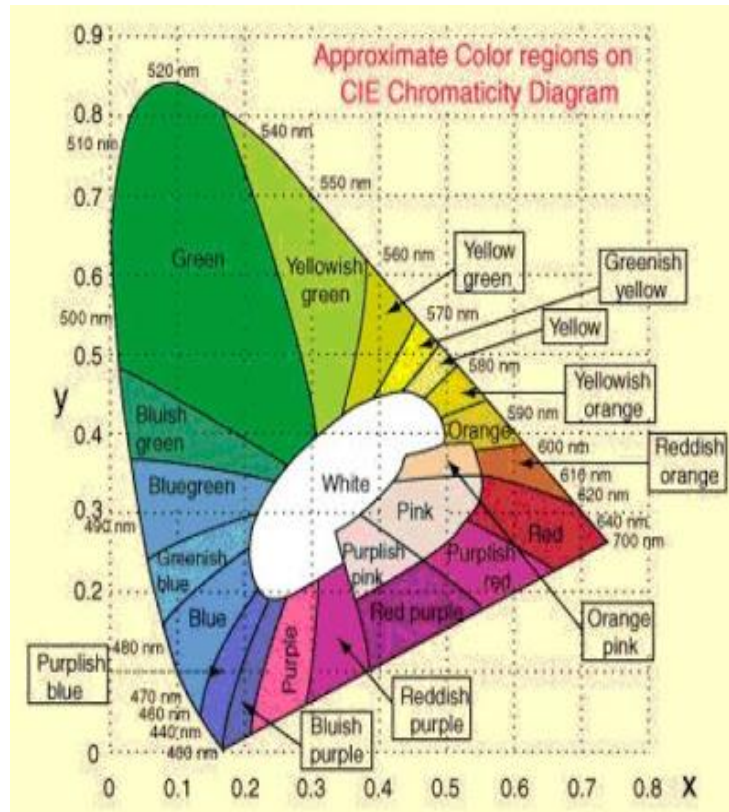
2.- El índice de amarilleamiento CIE se expresa como $YI = 100(1,28 X - 1,06 Z)/Y$, siendo (X, Y, Z) los valores triestímulo bajo D65 de la muestra a medir. Calcula, como ejemplo, el grado de amarilleamiento de la muestra blanca del problema anterior. (Ten en cuenta que si $YI < 0$, indicará que la muestra posee un matiz azulado.)

Referencias.

- 1.- **Métodos analíticos en alimentación. Métodos Oficiales.** *Productos derivados de la uva y similares.* Editado por PANREAC reactivos.
- 2.- **Micro Color DR LANGE.** Instrucciones de uso colorímetro triestímulos. Medición de sustancias pulverulentas. Prescripciones de trabajo para la medición de café molido.
- 3.- **ASTM E 313.** *Standard Practice for Calculating Yellowness and Whiteness Indices from Instrumentally Measured Color Coordinates.* Método estandarizado para medida de índice de blancura y de amarilleo de materiales opacos casi blancos.
- 4.- <http://enologia.blogia.com/temas/20-el-color.php>
- 5.- UNE40435. Determinación de diferencias de color según el sistema CIE Lab.
- 6.- UNE 72036.
- 7.- Jairo MONTOYA-LÓPEZ1*, Germán A. GIRALDO-GIRALDO2, Juan C. LUCAS-AGUIRRE. *Determinación del índice de blancura en harina de trigo comercial.* INDEX DETERMINATION IN WHEAT FLOUR WHITENESS. Vitae 19 (Supl. 1); 2012 S415
- 8.- http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/16140/1/Hoja_3.pdf
- 9.- <http://www2.konicaminolta.eu/eu/Measuring/pcc/es/part4/06.html>
- 10.- <http://www.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/learning-centre/colour-measurement/precise-colour-communication.html>
- 11.- http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_lab



Espacio de color (x, y, Y)



Práctica TFQ-14. Medida de viscosidad con viscosímetros capilares y rotacionales. (Técnicas Físico-Químicas)

El funcionamiento del viscosímetro Brookfield se basa en el principio de la viscosimetría rotacional; mide la viscosidad captando el par de torsión necesario para hacer girar a velocidad constante un husillo inmerso en la muestra de fluido a estudiar.



Viscosímetro tipo Brookfield

El par de torsión es proporcional a la resistencia viscosa sobre el eje sumergido, y en consecuencia, a la viscosidad del fluido. Los viscosímetros Brookfield son de fácil instalación y gran versatilidad y para su manejo no se necesitan grandes conocimientos operativos.

Se elegirá el modelo de viscosímetro Brookfield RV (RVF, RVF-100 o RVT), según el producto a ensayar y la precisión de la medida deseada. El tipo RVF tiene un límite inferior de unos 100 cP, mientras que los RVF-100 y el RVT, tienen un límite inferior de 20 cP.

Cada viscosímetro está compuesto por los siguientes elementos:

- Cuerpo del viscosímetro, constituido por un motor eléctrico y un dial de lectura.
- Vástagos intercambiables. Estos vástagos se numeran del 1 al 7, siendo el 1 el más grueso. Tienen, sobre su eje, una señal que indica el nivel de inmersión en el líquido.

El ajuste y calibrado de estos vástagos es efectuado por el propio fabricante. Otros ajustes y verificaciones posteriores se podrán llevar a cabo mediante líquidos newtonianos de viscosidad conocida.

Elección de la velocidad y del vástago.

Se elegirá la relación viscosidad/vástago, en función del valor de la viscosidad a medir, de la precisión deseada y del gradiente de velocidad ensayado. Es necesario hacer la elección de tal forma que la lectura en el dial esté comprendida entre el 20 y el 95 % de la escala. Para una mejor precisión, se aconseja utilizar el intervalo entre 46 y 95 %. Se monta el viscosímetro con su dispositivo de protección sobre su soporte. Se llena un vaso con el producto a ensayar, teniendo cuidado de no producir burbujas de aire. Introducirlo en el baño de agua a la temperatura del ensayo.

Esperar que se equilibren las temperaturas. Sumergir el vástago en el líquido a medir hasta la marca que figura sobre el eje.

Bajar el viscosímetro sobre su soporte y fijar el vástago al eje. Comprobar verticalidad y temperatura. Poner el motor en marcha.

Ajustar a la velocidad deseada. Desbloquear la aguja y dejar que gire hasta que se estabilice sobre el dial. Generalmente tarda entre 5 y 10 segundos. Bloquear la aguja y anotar la lectura.

Después, volver a poner en marcha el motor y tomar otra lectura. Se continúa tomando lecturas hasta que 2 valores consecutivos no difieran en $\pm 3 \%$, salvo otra indicación. Tomar el valor medio de las dos últimas lecturas.

CÁLCULOS: la viscosidad Brookfield RV, en cP, de la muestra a ensayar, se obtiene según la siguiente expresión: $\gamma = K \cdot L$ siendo K un coeficiente que depende de la relación velocidad / vástago utilizado y L el valor medio de las dos lecturas dadas como válidas.



Copas para calefacción con rosca en la base para ser acopladas a baño maría y regulador de temperatura Electemp.

Viscosímetro de copa termostatzado (<http://www.ictsl.net/index.html>)

Viscosímetros capilares.

Este tipo de viscosímetros es muy utilizado para la medida de viscosidades de fluidos newtonianos. La fuerza impulsora es normalmente la presión hidrostática del líquido del que se va a medir la viscosidad.

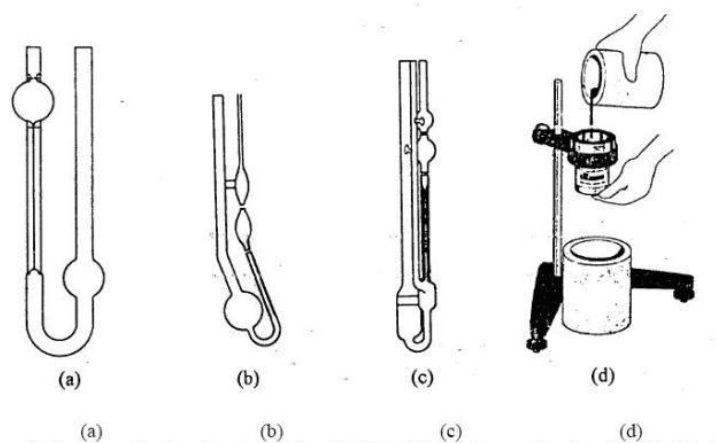


Figura 4. Tres tipos de viscosímetro capilar: (a) Ostwald; (b) Cannon-Fenske; (c) Ubbelohde. (d) Viscosímetro de orificio tipo "copo de Ford".

El diseño básico de este tipo de viscosímetros es el correspondiente al viscosímetro de Ostwald. En este viscosímetro el líquido es succionado hasta que llega a la marca superior del depósito que está a mayor altura, se acondiciona un determinado tiempo a la temperatura a la que se desea determinar la densidad.

A continuación se deja fluir hasta que pasa por la marca inferior y se mide el tiempo que ha transcurrido.

La viscosidad se calcula utilizando las ecuaciones siguientes:

$$\eta = K \cdot t \quad \text{o bien} \quad \nu = \eta/\rho = C \cdot t$$

donde **K** y **C** son constantes características del viscosímetro y **t** el tiempo de flujo, **ν** es la viscosidad cinemática del fluido. La viscosidad cinemática se mide en mm^2/s ó cSt

Con el paso del tiempo se han introducido modificaciones en el diseño del viscosímetro Ostwald, una de estas modificaciones es el viscosímetro Cannon-Fenske, el cual es aconsejable para uso general. Por otra parte el viscosímetro Ubbelohde se suele emplear para realizar medidas a distintas concentraciones.

Referencias.

- 1.- Norma **UNE-EN ISO 3104**. *Determinación de la viscosidad cinemática y cálculo de la viscosidad dinámica. Líquidos transparentes y opacos. Productos petrolíferos.*
- 2.- **ASTM D 445**. *Kinematic viscosity of transparent and opaque liquids.*
- 3.- *Método para determinar la viscosidad del asfalto empleando el viscosímetro rotacional I.N.V. E – 717 – 07.*

ftp://ftp.unicauca.edu.co/Facultades/FIC/IngCivil/Especificaciones_Normas_INV-07/Normas/Norma%20INV%20E-717-07.pdf

Práctica TFQ-15. Aceites y grasas. Espectrofotometría en la región del ultravioleta y determinación del índice de yodo.

El gran aumento que en los últimos años ha experimentado el consumo de aceites de semillas se debe a su gran riqueza en ácidos grasos insaturados, los cuales según estudios recientes reducen los niveles de colesterol en sangre y son beneficiosos para la prevención de enfermedades coronarias y arterioesclerosis.

Las semillas oleaginosas más utilizadas para la extracción de aceite son las de cacahuete, girasol, soja, maíz, colza, cártamo, etc.



Aceites de semillas

Pero hay que tener en cuenta que el organismo sólo puede asimilar estos ácidos hasta una determinada cantidad, a partir de la cual podrían resultar perjudiciales. Por ello, una opción más saludable es alternar los aceites de semillas con el aceite de oliva, cuya proporción de ácidos saturados e insaturados es más equilibrada. A esto hay que añadir que los aceites de semillas son más fácilmente alterables que el de oliva y además poseen un contenido vitamínico inferior. Otra diferencia importante es que los aceites de semillas, exceptuando el de cacahuete, sólo son comestibles después de refinarse y durante este proceso se pierden la mayor parte de las vitaminas liposolubles que contenía la semilla. Como ventaja se puede decir que resultan más económicos de precio.

La norma **UNE 55047. Materias grasas. Medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta**, establece el método adecuado para determinar la absorción de los aceites a determinadas longitudes de onda. La transmitancia en la región de los 270 nm se ve afectada tanto por procesos de auto-oxidación y enranciamiento y también como resultado de determinados tratamientos industriales o mezclas con aceite de orujo de oliva. Para aceite de oliva también se realizan medidas de transmitancia a 232 nm.



Aceite de oliva

Denominaciones y definiciones de las distintas calidades de aceite de oliva. Son aceites que, habiéndose obtenido del fruto del olivo exclusivamente por medios mecánicos u otros procedimientos físicos aplicados en condiciones que excluyan toda alteración del producto, no se someten a ningún otro tratamiento que no sea se lavado, decantación, centrifugado o filtración, excluidos los aceites obtenidos con el uso de disolventes o de coadyuvantes de acción química o bioquímica, por un procedimiento de reesterificación o como resultado de cualquier mezcla con aceites de otros tipos.

Los aceites de oliva vírgenes sólo se clasificarán y designarán de la forma siguiente:

- **Aceite de oliva virgen extra.** Aceite de oliva virgen que presenta una acidez libre máxima, expresada en ácido oleico de 0,8° y cuyas otras características se ajustan a lo establecido para esta categoría.
- **Aceite de oliva virgen.** Aceite de oliva virgen que presenta una acidez libre máxima, expresada en ácido oleico de 2° y cuyas otras características se ajustan a lo establecido para esta categoría.
- **Aceite de oliva virgen lampante.** Aceite de oliva virgen que presenta una acidez libre máxima, expresada en ácido oleico de más de 2° y/o cuyas otras características se ajustan a lo establecido para esta categoría.

Proceso para obtención del aceite de oliva refinado.

Es el proceso químico y físico al que se someten los aceites de oliva vírgenes que por sus características organolépticas y de acidez no son aptos para el consumo, y los aceites de orujo de aceituna. Durante el refinado se realizan las siguientes operaciones

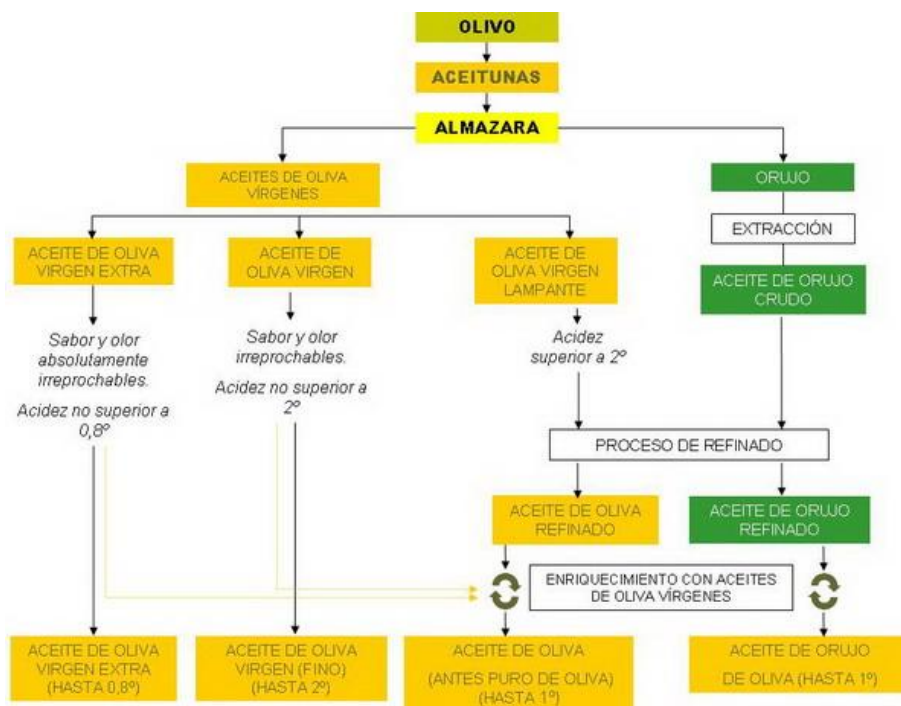
- *Winterización o invernación* consiste en el enfriamiento del aceite para eliminar los glicéridos de punto de fusión elevados (estearinas, glicéridos muy saturados, ceras y esteroides), es decir, en quitar los componentes que se solidifican con el frío. De esta forma se facilita la filtración posterior. La *invernación* se llevó a cabo primeramente dejando reposar y decantando el aceite contenido en tanques a la intemperie, durante la estación invernal. La gran demanda actual de aceites de esta clase hace que sea necesario el empleo de frío artificial y la filtración del líquido para separar las porciones sólidas. Típicamente, se somete al aceite a un enfriamiento rápido hasta 5 °C y se mantiene durante 24 horas.
- Separación de mucílagos, que elimina las lecitinas y las gomas.
- Decoloración o blanqueamiento es la eliminación del color mediante carbón activo o bien por tierras absorbentes como la bentonita. Se eliminan o corrigen los colores visualmente defectuosos como el verde oscuro casi negro o el pardo anaranjado de los compuestos oxidados.

- Neutralización o reducción del grado de acidez. Se lleva a cabo mediante tratamientos con hidróxidos alcalinos, operación denominada de saponificación, los jabones de estos ácidos grasos, obtenidos por adición de sosa, son fácilmente eliminables al ser insolubles en el aceite.
- Desodorización con tratamientos de agua a temperaturas de entre 160 y 180 °C con elevado vacío, donde se eliminan determinados aldehídos.

Este proceso no se realiza tampoco en las almazaras sino en refinerías específicas. Dependiendo de la intensidad de las alteraciones o defectos del aceite oliva DEFECTUOSO (corriente y lampante) el proceso de refinación del mismo puede ser total, si se realizan todas las etapas, o parcial en caso de que sólo se realicen algunas porque el aceite no esté muy defectuoso.

Durante este proceso se pierde la virginidad del aceite al entrar este en contacto con disolventes orgánicos y/o productos químicos, también se pierden vitaminas y antioxidantes, motivo por el que un Aceite de Oliva Refinado tiene un valor biológico prácticamente nulo y por ello es preciso que para su envasado y comercialización se acompañe o mezcle con Aceite de Oliva Virgen Extra convirtiéndose en Aceite Rectificado.

Aceite de orujo de oliva. Este tipo de aceite es el resultado de la mezcla de aceite de orujo de oliva refinado, procedente del refinado de aceite de orujo de oliva crudo que es el que se obtiene, por medios físicos o químicos, de los orujos resultantes de la molturación de la aceituna, y de aceite de oliva virgen o virgen extra. La graduación final obtenida, en ácido oleico, no será superior a 1°.



Determinación del índice de yodo.

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa. Será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas (por ejemplo el índice de yodo del ácido oleico es 90, del ácido linoleico es 181 y del ácido linolénico 274). A la vez que se determinan los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados se cuantifican también las sustancias acompañantes insaturadas, por ejemplo, los esteroides.

Por otro lado, es posible extraer conclusiones acerca de la identidad, composición (pureza, autenticidad) y calidad (frescura, vida útil) de un aceite o grasa, empleando métodos químicos, físico-químicos o sensoriales. Entre los métodos químicos (índices) destacan el de saponificación (cantidad de hidróxido potásico necesaria para saponificar 1 gramo de aceite o grasa), índice de yodo (cantidad de gramos de yodo que resulta ligada por cada 100 g de grasa), el índice de acidez y el índice de peróxidos. El yodo por sí mismo no reacciona con los dobles enlaces. En su lugar se utilizan derivados halogenados mixtos como ICl o IBr. El método recibe nombres distintos según el reactivo empleado Método de Wijs o Método de Hanus, respectivamente. La adición de halógenos a los dobles enlaces depende de la constitución y configuración de los compuestos insaturados, del tipo de halógeno y de disolvente, así como de las condiciones externas. La reacción no es cuantitativa. Por ello, para que los resultados sean repetitivos hay que establecer exactamente unas condiciones de trabajo estandarizadas e indicar la metodología utilizada.

Se fundamenta en que la grasa o aceite disuelto se hace reaccionar en su caso, con monobromuro de yodo en exceso. La cantidad de monobromuro de yodo que se adiciona a los dobles enlaces oxida una disolución de yoduro a yodo, y éste se valora con disolución normalizada de tiosulfato sódico. La reacción se realiza en la oscuridad para evitar que se produzcan reacciones laterales no deseadas de radicales inducidos por la luz (y con ello un gasto aparente de halógeno mayor). Dado que el reactivo halogenante va preparado en ácido acético glacial y es de concentración aproximada y variable deberá hacerse siempre un ensayo en blanco para calcular su equivalencia en yodo.

También se puede utilizar la norma: **UNE-EN ISO 3961:2013. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de yodo. (ISO 3961:2009)**, específica para este caso.

El procedimiento estándar para la determinación del índice de yodo en ésteres metílicos de ácidos grasos, viene contemplado en la norma: **UNE-EN 14111:2003. Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del índice de yodo.**

Práctica TFQ-16. Valoraciones con permanganato, yodometrías, complexometrías y contenido en tensoactivos.

Determinación del **cloro activo en lejías** según norma **UNE 55528**. Se define el cloro activo como la medida del poder oxidante del cloro presente como hipoclorito. Se expresa como cloro con un peso molecular relativo de 35,46. Se basa en que la muestra de ensayo se hace reaccionar con una disolución acidificada de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con una disolución patrón de tiosulfato sódico, usando como indicador una disolución de almidón.

La determinación del contenido en cloro en lejías y otros agentes blanqueantes es una determinación muy usual y una aplicación de las valoraciones redox, concretamente las yodometrías. El fundamento químico es la reacción:



Sin embargo, los productos mencionados consisten por lo general en una disolución de hipoclorito o de clorito, o bien en una mezcla de hipoclorito y cloruro. Esto no es conveniente, ya que basta con acidificar para que el hipoclorito y el clorito se encuentren en la forma cloruro. Por lo cual se puede considerar:

El cloro como tal en disolución da lugar a $1 \text{ mol Cl}_2 \rightarrow 1 \text{ mol I}_2$; si el cloro se hidroliza parcialmente dando lugar a hipoclorito $1 \text{ mol Cl}_2 \rightarrow 1 \text{ mol ClO}^- \rightarrow 1 \text{ mol I}_2$; si el cloro se hidroliza parcialmente dando lugar a clorito, se tiene:



Se observa que sea cual sea la especie que existe en disolución y el grado de hidrólisis que pueda presentar el cloro, siempre se cumple la equivalencia de que $1 \text{ mol Cl}_2 \rightarrow 1 \text{ mol de I}_2$, por lo que el resultado de la valoración se expresa como contenido de cloro útil o cloro disponible en la muestra a analizar. Como medio ácido la reacción se suele llevar a cabo en medio sulfúrico o en medio acético.

Las lejías de uso doméstico suelen tener un contenido en cloro, expresado como contenido en cloro activo a la salida de fábrica de 35 – 40 gramos.

Determinación del **oxígeno activo en detergentes** en polvo según norma **UNE 55546**. Esta norma fija un método volumétrico de determinación del oxígeno activo en polvos para lavar comerciales. Este método es aplicable a la determinación de los peroxihidratos, por ejemplo el perborato sódico. Consiste en la reducción mutua con desprendimiento de oxígeno del peroxihidrato y del permanganato potásico en una disolución ácida. Eventualmente la adición de sulfato de manganeso evita un periodo de inducción relativamente largo que puede producirse en algún caso, la adición de nitrato de bismuto forma complejo con el EDTA y demás agentes secuestrantes a base de acetatos de amina, eliminando toda interferencia posible. La adición de sulfato de aluminio permite una reacción preferente con los fosfatos que puedan estar presentes y evita la formación de complejos con los iones manganeso que en ocasiones puede producirse y alterar el viraje.

Determinación de la **dureza del agua por complexometría** según norma **UNE 77040** o norma sustituida. Originalmente se entendía como dureza del agua la medida de la capacidad del agua para precipitar jabón. El jabón precipita por los iones calcio y magnesio presentes en el agua. Otros cationes polivalentes también pueden precipitar jabón, pero frecuentemente están en forma compleja y su papel en la dureza del agua puede ser mínimo o difícil de determinar. En la práctica la dureza total se define como la suma de las concentraciones de calcio y magnesio, ambas expresadas como carbonato cálcico, en miligramos por litro. Si se añaden pequeñas cantidades de un colorante tal como negro de eriocromo T o calmagite en una solución acuosa conteniendo iones de calcio y magnesio a un pH de $10,0 \pm 0,1$, la solución vira al color rojo vino. Se fundamenta en que la sal disódica del ácido etilendiamino-tetrácetico forma un quelato complejo, soluble cuando se añade a una disolución que contenga ciertos cationes metálicos, Si se añade AEDT como titulador, el calcio y el magnesio se complejarán y cuando todo el calcio y magnesio hayan formado un complejo, la solución vira del rojo vino al azul, indicando el punto final de la valoración.

Determinación del **contenido en tensoactivos** (surfactantes aniónicos y catiónicos) en detergentes.

Introducción.

Los compuestos tensoactivos poseen un enorme interés industrial debido a sus múltiples aplicaciones tecnológicas. Todos los sectores de la industria química los utilizan en la producción o en la aplicación de sus productos. Son fundamentales en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, textil, de pigmentos y pinturas y lubricantes entre otras. La industria de los agentes tensoactivos consume grandes cantidades de materias primas petroquímicas tales como alcanos lineales, 1-alquenos, n-alcoholes, alquilbencenos y óxido de etileno entre otros y de grasas naturales. Aproximadamente se consumen en el mundo unos 6000 millones de toneladas de compuestos tensoactivos cada año.

Algunos ejemplos de moléculas tensoactivas son los siguientes:

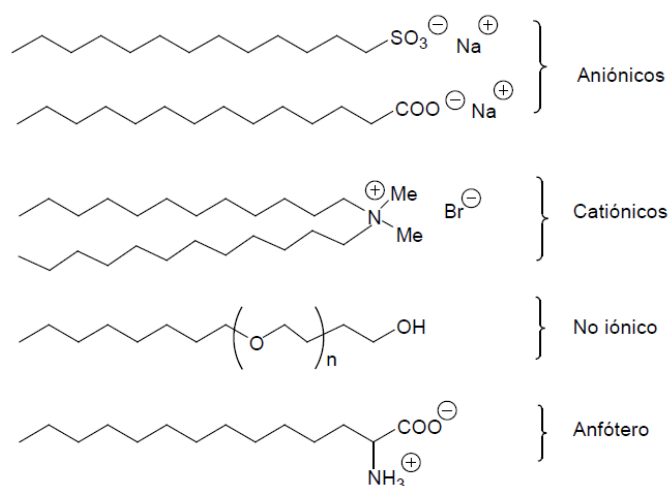


Figura 4

Como consecuencia de esta disminución de la tensión superficial estas sustancias tienen las siguientes propiedades:

- poder detergente o capacidad para eliminar la suciedad y la grasa de una superficie (piel, tejido etc.);
- poder emulgente o capacidad para producir dispersiones coloidales de grasa en medio acuoso o de agua en medio de grasa;
- poder espumógeno que da lugar a la formación de espuma y
- actividad mojante que hace que el agua impregne una superficie de forma homogénea.

El poder detergente y la capacidad para formar emulsiones tienen el mismo principio, las moléculas de tensoactivo se adsorben sobre las partículas de aceite o grasa eliminándolas de la superficie en el primer caso, y formando micelas estables, en el segundo, debido a la repulsión entre partículas con carga negativa. El poder espumógeno se debe a que una superficie acuosa protegida por una capa lipófila envuelve burbujas de aire (Figura 5).

Los tensoactivos aniónicos representan el 55% de los tensoactivos producidos anualmente. Los más comunes son los siguientes:

- sales de ácidos carboxílicos de cadena larga, denominadas jabones, y
- diversos sulfonatos y sulfatos de cadena larga, utilizados fundamentalmente como detergentes.

Los jabones son las sales de sodio o de potasio de los ácidos grasos de 12 a 18 átomos de carbono. Se obtienen por hidrólisis de grasas y aceites naturales con NaOH o KOH. También se usa un proceso en dos pasos, hidrólisis a presión (240 °C, 40 atm) con óxido de Zn como catalizador. Después de la hidrólisis se separan los ácidos (fase orgánica) del glicerol (fase acuosa). Mediante destilación a vacío se separan las fracciones C12-C-18 y finalmente se tratan con la base adecuada. Los jabones de C16-C-18 no irritan la piel pero son poco solubles en agua. Los C-12-C-14 son los más espumógenos. Las materias primas más importantes para fabricar jabón son el sebo y el aceite de coco. Aunque los productos basados en el jabón son satisfactorios presentan el inconveniente de la precipitación de los carboxilatos de calcio y magnesio cuando se utilizan en aguas duras (cortado), de ahí su escaso uso como agentes de limpieza para lavadoras y lavavajillas.

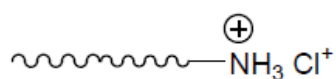
Durante los últimos 30 años, **los surfactantes no iónicos** han alcanzado cada día mayor importancia, hasta representar hoy más del 25% de la producción total de tensoactivos. Los tensoactivos no iónicos están formados por una cadena alquílica larga y un grupo sin carga pero muy polar. El grupo polar debe ser lo suficientemente hidrófilo para que la molécula sea soluble en agua. Los grupos polares más utilizados son: polioles (a veces azúcares naturales), polioxietilenos (éteres de polialcohol), diaminas y aminas etoxiladas.

Estos tensoactivos no producen iones en solución acuosa y por este hecho son compatibles con cualquier otro tipo de tensoactivos; es por esto que son excelentes candidatos para formulaciones complejas que se utilizan, a menudo, en muchas aplicaciones prácticas. Por otra parte estos tensoactivos al no tener carga son menos sensibles a los electrolitos, especialmente a los cationes divalentes, que los tensoactivos aniónicos, y pueden por lo tanto ser utilizados en presencia de una salinidad alta. Los tensoactivos no iónicos son buenos detergentes, humectantes y emulsionantes. Algunos poseen excelentes propiedades espumantes. Algunos presentan un muy bajo nivel de toxicidad y se utilizan en la fabricación de fármacos, cosméticos y alimentos. Actualmente, se fabrican tensoactivos no iónicos para una gran cantidad de productos de uso doméstico e industrial, condicionados bajo forma de polvo o líquido.

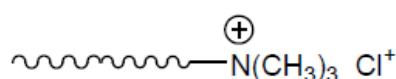
Los compuestos de polioxietileno son los más utilizados como tensoactivos no iónicos (representan un 80 % del total de no iónicos) y tienen aplicación como detergentes, sobre todo en formulaciones líquidas, como emulgentes para formulaciones insecticidas y en la fabricación de pinturas por emulsión. Estos se obtienen, fundamentalmente por reacción de óxido de etileno con:

- alcoholes de cadena larga sintetizados por el proceso Alfol desde etileno o por reducción de ácidos grasos (40%),
- alquilfenoles (20%),
- ácidos grasos (20%),
- azúcares naturales como el xilitol, sorbitol o el glicerol (10%) y
- derivados de aminas y amidas (10%).

Los tensoactivos catiónicos representan un 4% del total de la producción de agentes tensoactivos. Su fabricación es mucho más cara que la de los anteriores y es por esta razón que sólo se utilizan en aplicaciones especiales. La gran mayoría de estos son compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o sal de amonio cuaternario.



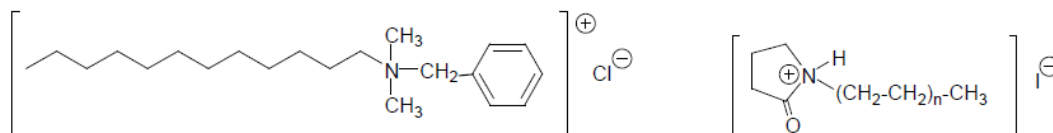
sal de amina grasa



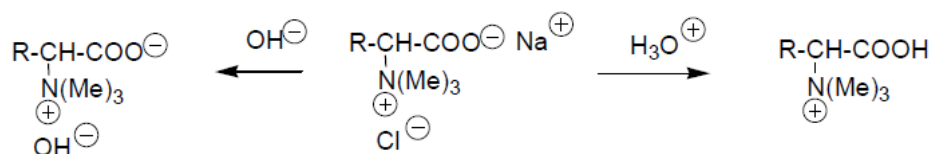
sal de amonio cuaternario

Estas moléculas son de poca utilidad en limpieza porque la mayoría de las superficies tienen una carga negativa y los cationes se adsorben sobre ellas en lugar de solubilizar la suciedad adherida. Presentan propiedades bactericidas, antisépticas y alguicidas (inhiben el crecimiento de organismos monocelulares como las bacterias y las algas), son agentes antiestáticos, suavizantes, inhibidores de corrosión, agentes de flotación y puedan ser utilizados tanto en productos industriales como para uso doméstico.

Debido a su poder antiséptico, bactericida y alguicida se usan como desinfectantes. Las moléculas se orientan en la interfase entre la membrana bacteriana y el agua o el aire, formando una película cerrada que impide la respiración del organismo y éste muere. Uno de los tensoactivos usados para tal fin es cloruro de benzalconio utilizado en pastillas para la afonía y la polivinilpirrolidona yodada (betadine) utilizada para desinfectar heridas. También son útiles para desinfectar granjas avícolas, piscinas y material sanitario.

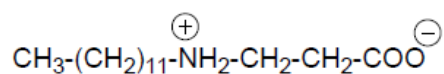


Los surfactantes llamados anfóteros poseen dos grupos funcionales, uno aniónico y otro catiónico. En la mayoría de casos es el pH quien determina el carácter dominante favoreciendo una u otra de las posibles disociaciones: aniónico a pH alcalino, catiónico a pH ácido. Cerca de su punto isoeléctrico son realmente anfóteros, es decir poseen dos cargas a la vez y presentan a menudo un mínimo de actividad superficial.

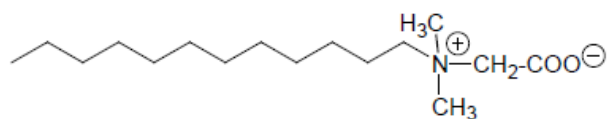


Estos surfactantes son en general muy poco irritantes, compatibles con los otros surfactantes y en la mayoría de los casos ellos pueden utilizarse en fórmulas farmacéuticas o cosméticas. Estos tensoactivos a pH cercanos a 7 son poco irritantes y se utilizan en champús y productos para la limpieza manual de los platos.

Casi todos los anfóteros poseen un grupo catiónico de tipo amina o amonio, el cual puede estar eventualmente bloqueado por una cuaternización. Los más utilizados son derivados de aminoácidos, derivados del ácido 3-aminopropiónico y las alquilbetainas. Los derivados del ácido 3-aminopropiónico alcanzan el punto isoeléctrico a pH de 4. Son solubles en disolución acuosa ácida y básica y se adsorben fácilmente por la piel, cabellos y textiles. Se usan como suavizantes para el pelo y para tejidos, así como humectantes en cosmética.



Las alquilbetainas alcanzan el punto isoeléctrico a pH 7. Son anfóteras a pH neutro y básico, y catiónicas a pH ácido. Se usan como aditivos para inhibidores de la corrosión y para suavizantes del pelo y textiles.



Debido a que actúan en un gran intervalo de pH, pueden utilizarse con NaOH en limpiadores alcalinos para superficies grasas y con limpiadores ácidos, con HCl, para superficies oxidadas. **(FUENTE: Autor: Ascensión Sanz Tejedor. Química Orgánica Industrial, Universidad de Valladolid).**

Parte experimental.

1.- Identificación del tipo de tensoactivo.

Es posible conocer a priori, la naturaleza del surfactante o tensoactivo (aniónica, catiónica o no iónica), mediante la **prueba del azul ácido de metileno**. Para lo cual comenzamos por preparar la disolución de azul de metileno, disolviendo 0,5 g de azul de metileno en agua destilada en vaso de precipitados, pasar a matraz aforado de 100 ml y enrasar con agua destilada.

La disolución ácida de azul de metileno se prepara disolviendo aprox. 50 g de sulfato de sodio anhidro en 120 ml de disolución de ácido sulfúrico 2N y se añaden 6 ml de la disolución de azul de metileno.

Tomar aproximadamente 10 g de la muestra de detergente problema, disolver con agitación suave en agua destilada, filtrar y llevar a 1 litro en matraz aforado.

Verter en una probeta con tapón de 100 ml o similar, volúmenes iguales de la disolución ácida de azul de metileno y de cloroformo (densidad 1,49 g/ml) y aproximadamente 25 ml de la disolución problema de detergente, invertir la probeta tres o cuatro veces, agitando de forma suave, se podrá apreciar lo siguiente:

Si la fase de cloroformo es NO COLOREADA, la **fase acuosa COLOREADA AZUL** y el efecto no se ve alterado por la adición de 0,15 ml de disolución acuosa al 0,2% de laurilsulfato sódico, el **tensoactivo es CATIÓNICO**. Si el color se transfiere a la fase cloroformo, puede estar presente un tensoactivo NO IÓNICO.

Si la **coloración azul** está inicialmente en la **fase del cloroformo** y después de la adición de 0,15 ml de disolución al 0,2% de cloruro de bencetonio (Hyamina), el color sigue en la fase cloroformo, el **surfactante es ANIÓNICO**; si el color se transfiere a la fase acuosa puede estar presente un surfactante NO IÓNICO.

Como ejemplos típicos de tensoactivos el laurilsulfato sódico ó dodecilsulfato sódico es un surfactante o tensoactivo aniónico y el cloruro de bencetonio o hyamine es del tipo catiónico.

2.-Determinación cuantitativa de la materia activa aniónica en detergentes. Se sigue la norma UNE 55520:1991. Agentes de superficie. Detergentes. Determinación del contenido en materia activa aniónica. Método de valoración directa en dos fases.

El fundamento del método es el siguiente, se determina la materia activa aniónica en un medio formado por una fase acuosa y una fase de cloroformo, por volumetría con una disolución patrón de un tensoactivo catiónico (cloruro de bencetonio) en presencia de un indicador que es una mezcla de un colorante catiónico (bromuro de dimidio) y de un colorante aniónico (azul ácido 1). El proceso químico es el siguiente, la materia activa aniónica forma con el colorante catiónico una sal que se disuelve en cloroformo, al cual comunica una coloración rosa-rojiza. Durante la valoración, el cloruro de bencetonio desplaza de esta sal al bromuro de dimidio. Este pasa a la fase acuosa, abandonando la fase cloroformo que pierde su coloración rosa. Un exceso de cloruro de bencetonio forma una sal con el colorante aniónico, la cual se disuelve en la fase de cloroformo coloreándola de azul.

**** FIN ****

Como ANEXOS y a título informativo se incluyen:

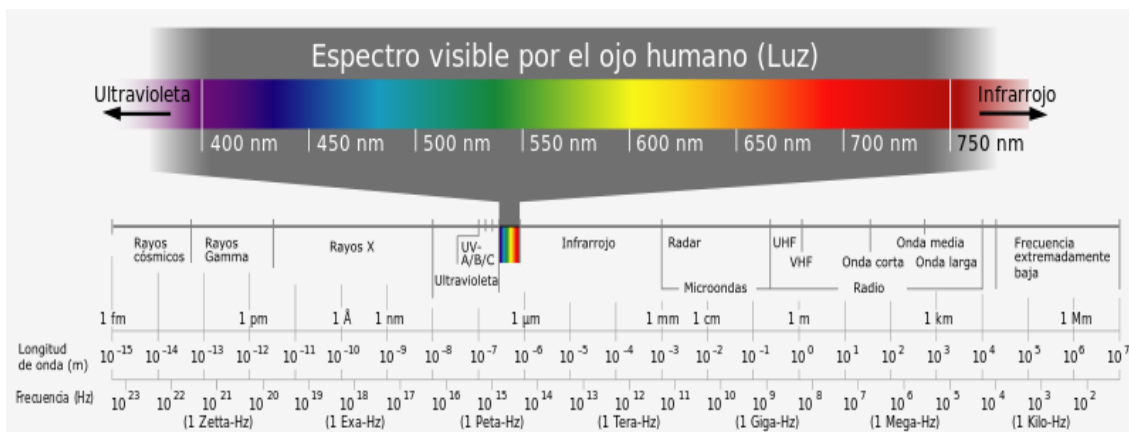
1.- Resumen de espectroscopía molecular.

2.- Instrumentación en espectrometría óptica.



Prácticas con técnicas instrumentales de análisis físico-químico en laboratorios industriales

ANEXOS



E.T.S. INGENIEROS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID


Espectroscopia Molecular


Absorción UV


Espectroscopia UV

- Ultravioleta lejano λ 120–180 nm.
- Ultravioleta λ 180-400 nm
- Visible λ 400-800 nm
- **OBJETIVOS**
- Analisis Cualitativo
- Analisis Cuantitativo (Valoraciones Fotométricas)
- Estudio de Complejos
 - Estabilidad
 - Estequiometría
 - Calculo de Constantes
- Estudio de Sistemas Acido Base (valores pK_a)
- Estudios cinéticos

Especies absorbentes

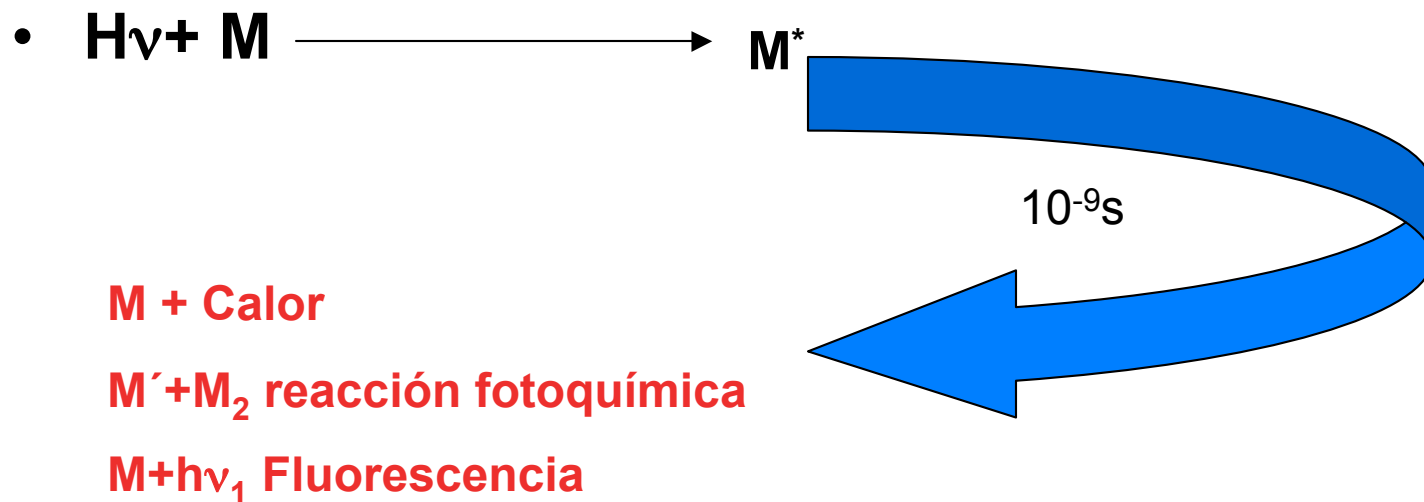
- Absorción  Transiciones Electrónicas
electrones de valencia

Compuestos Orgánicos  Teoría Orbitales Moéculares

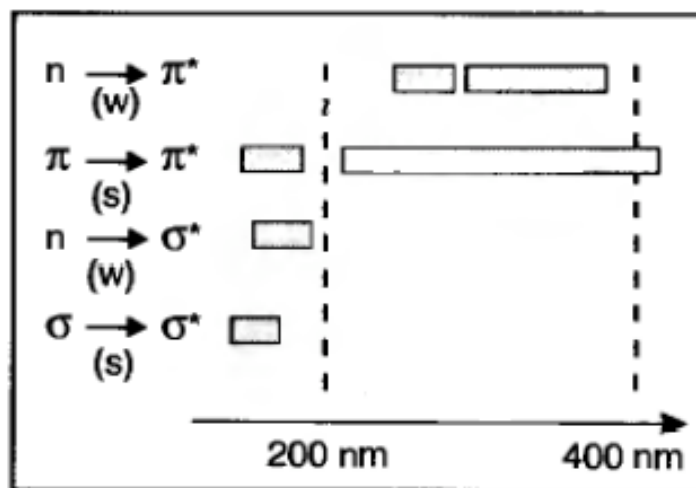
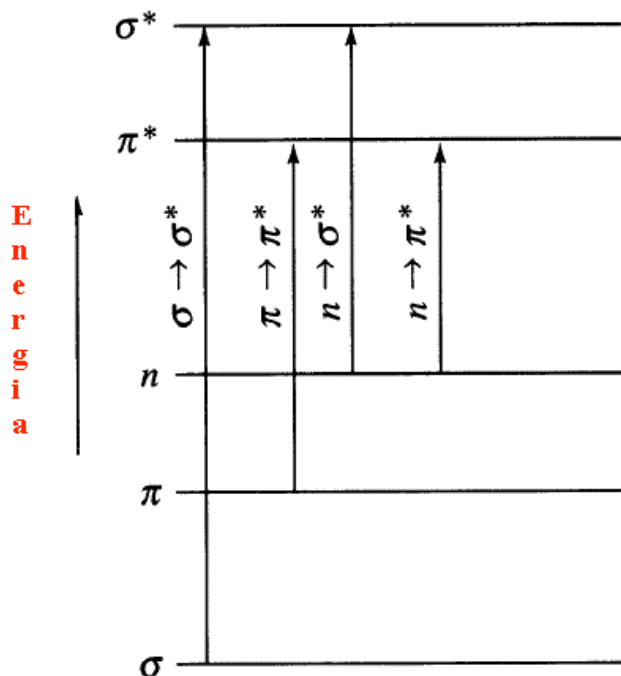
Inorgánicos  Campo Ligando

Compuestos de Transferencia de Carga(Ox.Red Internas)

- La Absorción se adjudica a grupos definidos : **Grupos Cromoforos**

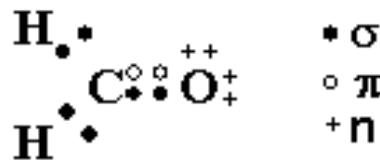
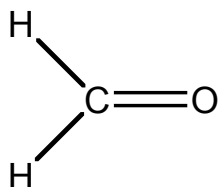


Transiciones electrónicas posibles Compuestos orgánicos



s=Transición fuerte W=Transición débil

Absorción Compuestos Orgánicos



Transición	Energía (λ)	Absortibilidad	Tipo de moéculas
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	ΔE grande ($\lambda < 150$ nm)	$\epsilon = 10^1 - 10^0$ L/mol·cm	Hidrocarburos saturados
$n \rightarrow \sigma^*$	ΔE pequeña ($\lambda = 150 - 250$ nm)	$\epsilon = 200 - 2000$ L/mol·cm	Compuestos con: (halogenos, N, O, S)
$n \rightarrow \pi^*$	ΔE pequeña ($\lambda = 200 - 295$ nm)	$\epsilon = 10 - 10,000$ L/mol·cm	Moléculas con heteroátomos En la parte no saturada
$\pi \rightarrow \pi^*$	ΔE grande $\lambda = 170 - 700$ nm	$\epsilon = 100 - 20000$	Compuestos con dobles enlaces etilénicos

Grupos cromóforos

Grupo	Estructura	Transición
Acetilénico	$\text{—C}\equiv\text{C—}$	$\pi \longrightarrow \pi^*$
Amida	$\text{—C}\begin{matrix} \text{=O} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	$\pi \longrightarrow \pi^*$ $n \longrightarrow \pi^*$
Carbonilo	>C=O	$\pi \longrightarrow \pi^*$ $n \longrightarrow \pi^*$
Carboxilato	$\text{—C}\begin{matrix} \text{=O} \\ \text{O}^- \end{matrix}$	$\pi \longrightarrow \pi^*$ $n \longrightarrow \pi^*$
Ester	$\text{—C}\begin{matrix} \text{=O} \\ \text{OR} \end{matrix}$	$\pi \longrightarrow \pi^*$ $n \longrightarrow \pi^*$
Etilénico	>C=C<	$\pi \longrightarrow \pi^*$
Nitro	—NO_2	$\pi \longrightarrow \pi^*$ $n \longrightarrow \pi^*$
Oxima	>C=N—	$\pi \longrightarrow \pi^*$ $n \longrightarrow \pi^*$

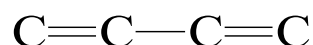
Grupos Auxocromos

- Determinadas agrupaciones atómicas que por sí mismas no comunican color a la molécula que pertenecen, pero son capaces de reforzar la acción de un cromóforo.
 - Suelen contener grupos funcionales con electrones en orbitales no enlazantes y que, en consecuencia, pueden absorber únicamente en el ultravioleta lejano, contribuyen a la estabilización de los orbitales π^*
 - **Provocan un efecto hipercrómico**
 - son: -OH, -NH₂, -Cl, -S

Interpretación de los Espectros de absorción en la Región Ultravioleta Visible

- Reglas
 - 1ª.- Hay esencialmente cuatro sistemas moleculares considerados como principales
 - **Dienos conjugados**
 - **Anillo bencenico monosustituido**
 - **Anillo bencenico disustituido**
 - **Grupos carbonilos conjugados**
 - 2ª.- Señalar el grupo principal y asignarle el valor de λ que le corresponde al máximo de absorción .
 - 3ª.- Por cada sustituyente o presencia de otros grupos se adiciona al valor anterior la λ que le corresponda y se calcula la suma total que será la λ_{max} del máximo de absorción de la molécula.

Dienos Conjugados



- absorbe a 217 nm ;
- Un grupo alkilo enlazado al sistema conjugado, produce un aumento de 5nm en el máximo.
- Si la agrupación dienica está formando anillo, el incremento es de 36 nm
- Absorción del grupo principal dieno 217 nm
- Doble enlace adicional 30
- Dieno en forma anillo 36
- Doble enlace en anillo adyacente 5
- Cada grupo alquilo o residuo de anillo 5
- Presencia de grupos Auxocromos:
- O-acilo
- O-Alquil 6
- S-Alquil 30
- Cl,Br 5
- N-alquil 60

Compuestos con anillos bencenicos sustituidos

- Hay dos bandas asignadas al anillo bencenico de 203 y 254 nm
- λ_{\max} esperables en bencenos monosustituidos

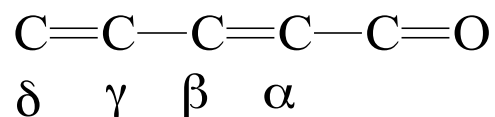
-

Sustituyente	Banda 1 λ_{\max}	Banda 2 λ_{\max}
-H	203	254
-NH ₃ ⁺	203	254
-CH ₃	224	271
-I	207	257
-Cl	209	263
-Br	210	261
-NH ₂	230	280
-OH	210	270
-COOH	230	273
-O ⁻	235	287
-NHAc	238	
-CH=CH ₂	248	
-CHO	249	
-Ph	251	
-NO ₂	268	

Anillo bencénico disustituido

- La presencia de grupos aceptores de electrones ,(como NO₂) y de donadores de electrones (como OH) situados en *orto* o en *para* tienden a cancelar el efecto producido y el espectro es semejante al del benceno monosustituido
- Dos grupos dadores o dos grupos aceptores de electrones en posición *para* producen un espectro muy poco diferente del derivado monosustituido.
- El mayor efecto en el espectro con desplazamiento del máximo hacia λ más altas lo provocan la presencia de grupos aceptores o donadores en posición *para*

Sistemas con Grupos Carbonilos Conjugados

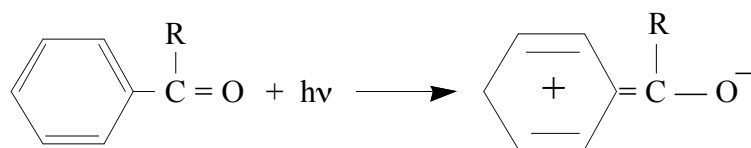


- El máximo de absorción a esta agrupación es de 215nm
- La λ_{max} se va modificando:
 - En función de la extensión de dobles enlaces
 - Formación de anillo de 5 o 6 eslabones
 - Que la extensión del doble enlace este fuera del anillo,
 - Que el dieno forme anillo,
 - Presencia de grupos auxocromos

- **Valor asignado a la agrupación principal formando :**
- un anillo de 6 miembros α,β - no saturado o una cetona acíclica 215nm
- Valor asignado si forma anillo de 5 miembros 202
- Valor si el grupo carbonilo es aldehído 207
- **Las adiciones principales al valor de la agrupación principal son**
- Dieno formando anillo 39
- Extensión de la conjugación con doble enlace 30
- Por cada doble enlace fuera del anillo 5
- Por cada sustituyente alquilo en
- Carbono α 10
- Carbono β 12
- Carbono γ u otro 18
- Por cada OH
- En α 35
- En β 30
- En γ 50
- Si hay un grupo NR₂ en β 95

Bandas de transferencia de carga

- Se originan cuando se produce transferencia de electrones de una parte a otra de un sistema.
 - Uno de sus componentes tiene características de dador de electrones y otro de aceptor.
 - Como consecuencia de esta transferencia de electrones se origina un estado excitado que es el resultado de un proceso de oxidación-reducción interna.
 - Ejemplos: $\text{Fe(III)-SCN}^- + h\nu \longrightarrow \text{Fe(II)-SCN}$

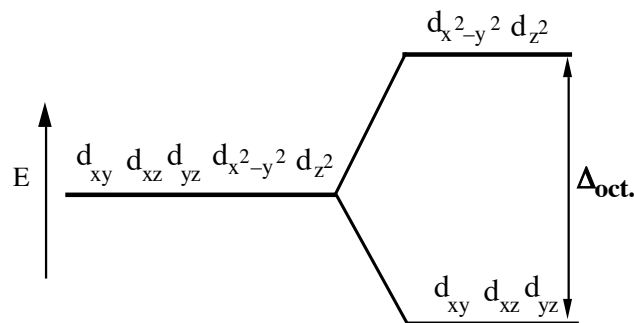


Iones Inorganicos

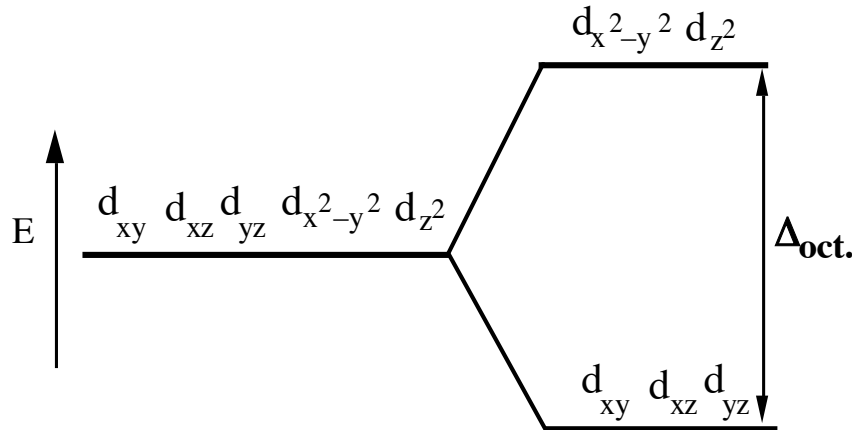
Absorción es debida a las transiciones en los orbitales d

Los orbitales **d** de un átomo o un ion de un elemento de transición, en ausencia de un campo magnético o eléctrico externo están *degenerados*, no siendo necesaria la absorción de radiación para promover un electrón de un orbital a otro.

La aproximación de los átomos dadores (cargas puntuales) a produce un campo eléctrico que elimina la degeneración existente en el grupo de orbitales **d** y los divide en dos grupos, los **t_{2g}** con energía inferior y los **e_g** con energía superior



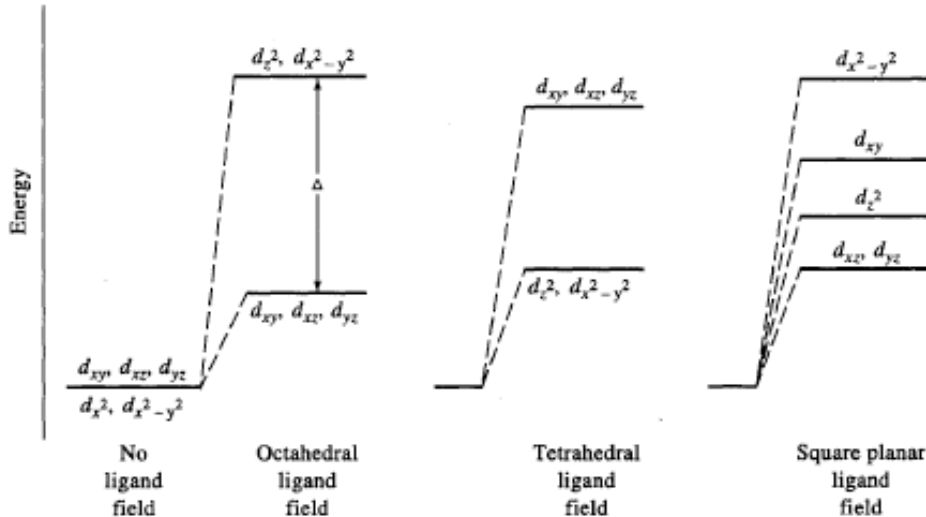
Bandas de Campo Ligando



Δ_{oct}

Depende de las características

- Del ion metálico (carga y número cuántico principal del orbital **d**)
- Del ligando (distribución de su densidad de carga y polarizabilidad).



Estabilización por Campo Ligando

λ_{\max} para el complejo

Aumento de la fuerza del campo ligando

	6Cl ⁻	6H ₂ O	6NH ₃	3en	6CN ⁻
Cr(III)	736	573	462	456	380

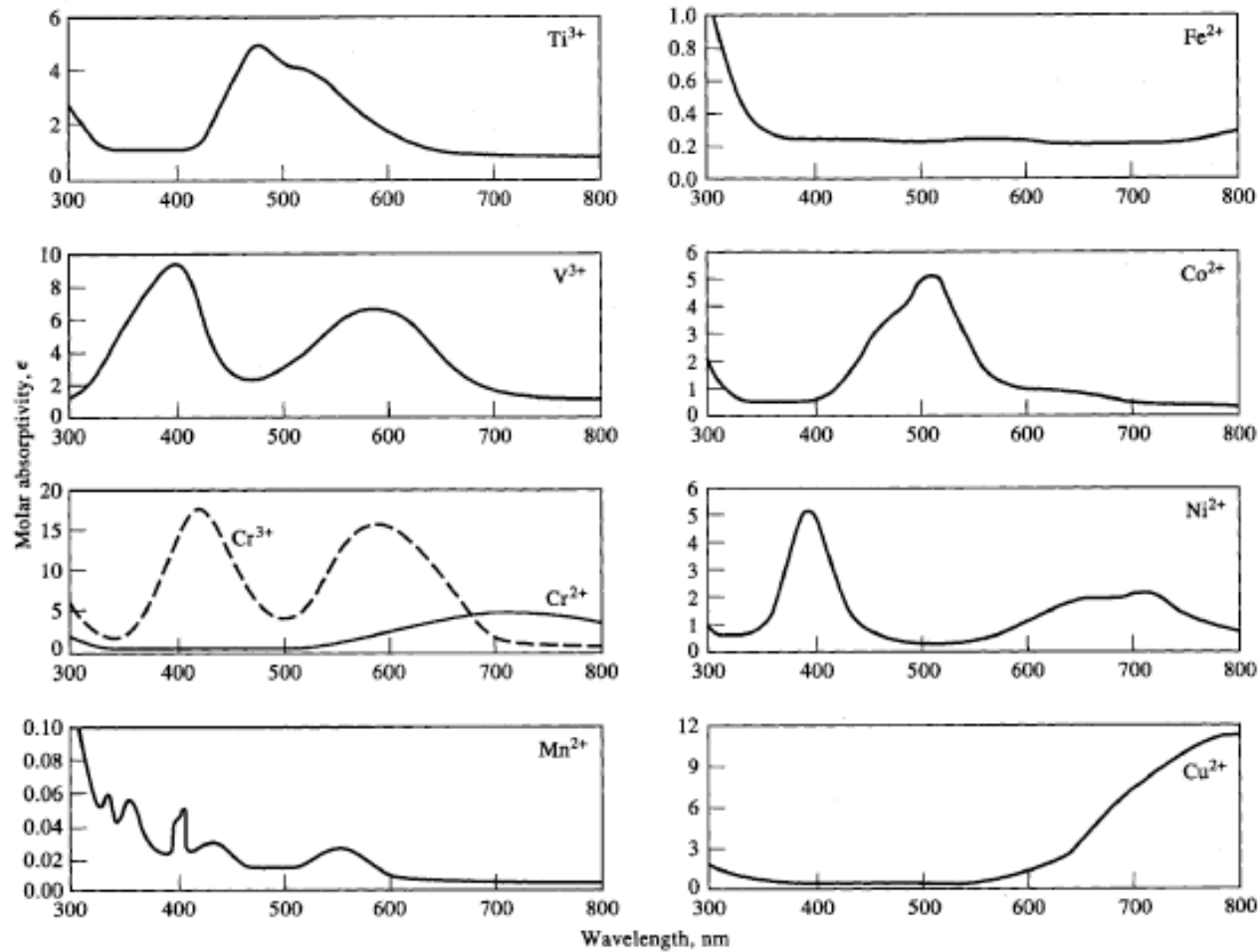
Serie espectroquímica

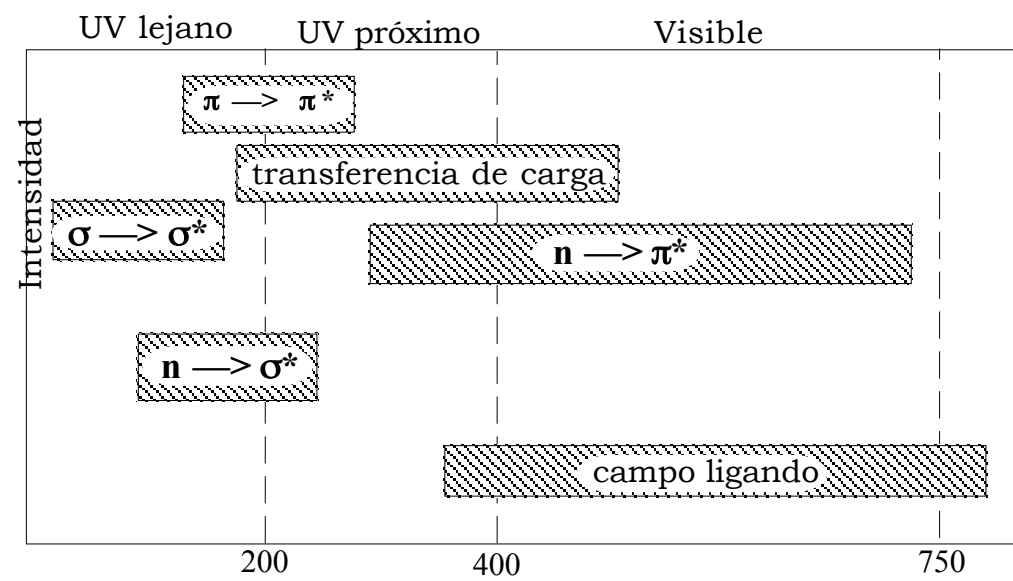
I < Br < Cl < F < OH < C₂O₄²⁻ ~ H₂O < SCN⁻ < NH₃ < en < NO₂⁻ < CN⁻

vis

UV

Absorción acuocomplejos





INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

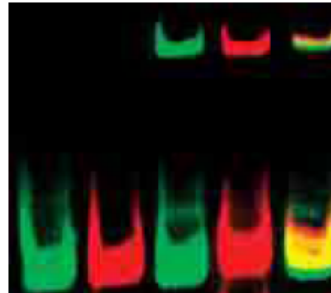


Los primeros instrumentos espectroscópicos se desarrollaron para utilizarse en la región **visible**, por eso se llaman instrumentos ópticos. Hoy también incluyen la espectroscopia **UV** e **IR**

En este apartado se estudiará la instrumentación para espectroscopia UV, visible e infrarrojo

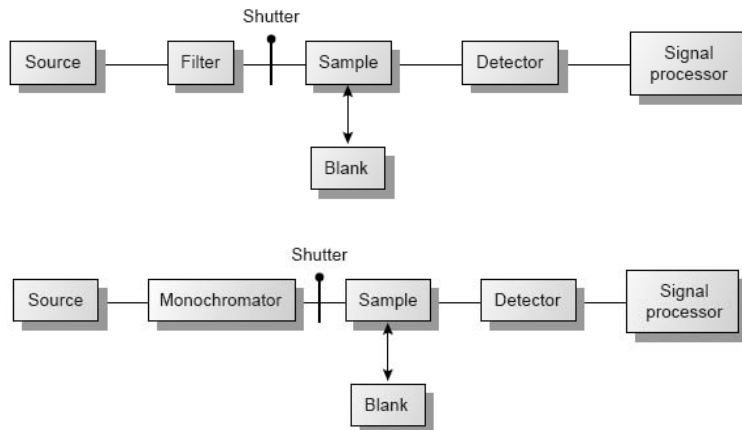
La instrumentación para espectrometría óptica se basa en seis fenómenos:

- 1) Absorción
- 2) Fluorescencia
- 3) Fosforescencia
- 4) Dispersión (*scattering*)
- 5) Emisión
- 6) Quimioluminiscencia



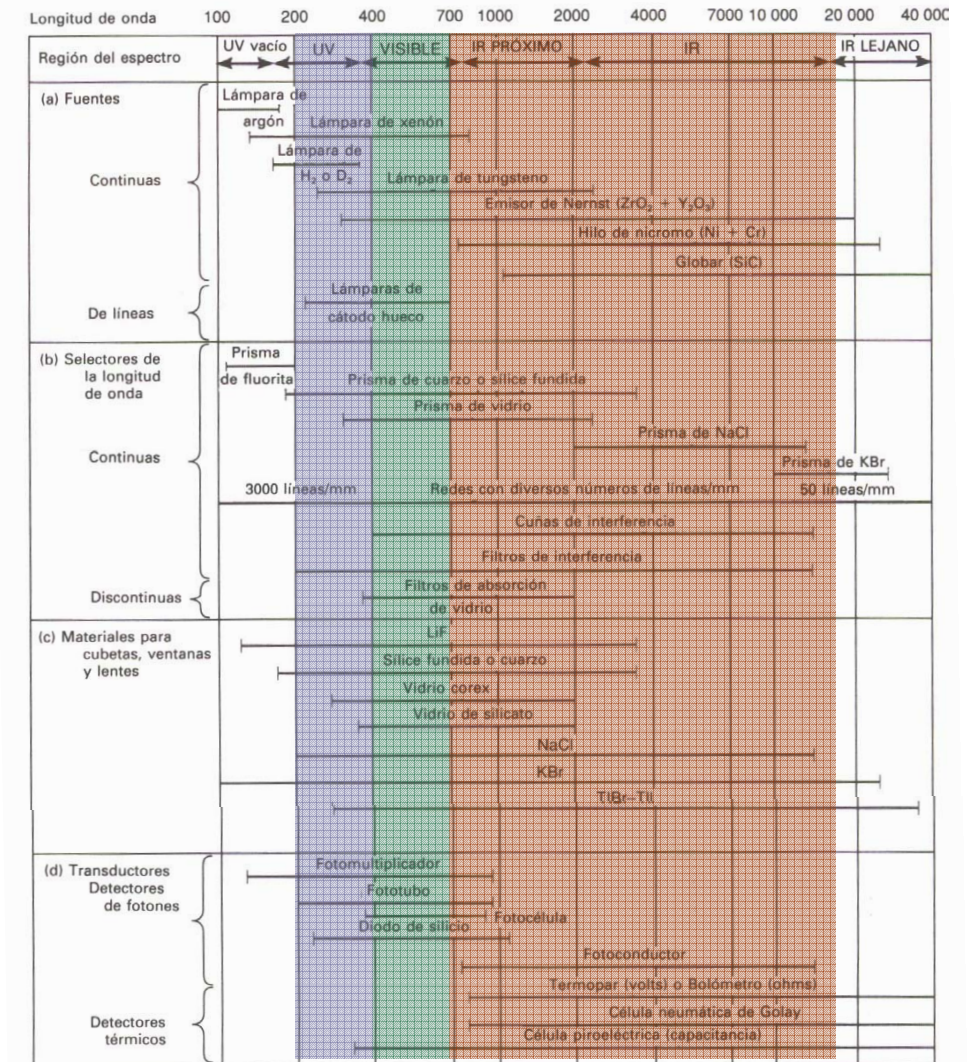
Los instrumentos espectroscópicos característicos incluyen cinco componentes:

- 1) Fuente de energía radiante
- 2) Recipiente transparente para contener la muestra
- 3) Un dispositivo que aisle una región del espectro
- 4) Detector de la radiación
- 5) Sistema de tratamiento y lectura de la señal



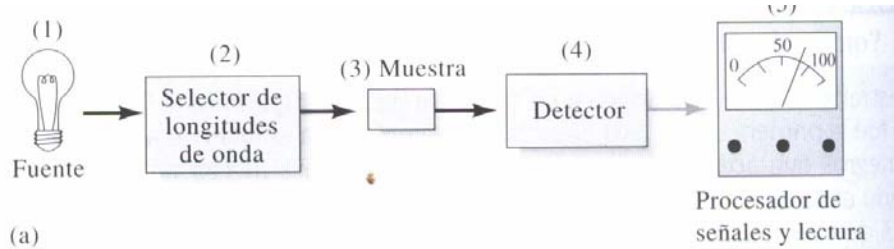
INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes y materiales para los instrumentos espectroscópicos

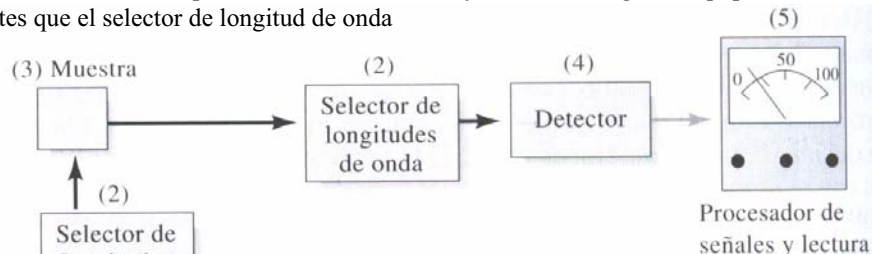


INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

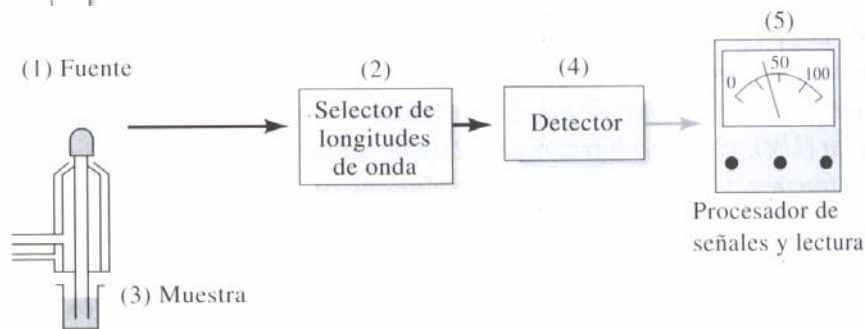
Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica



Configuración para espectroscopia de absorción. La fuente de radiación de la longitud de onda seleccionada se envía a través de la muestra, y la radiación transmitida se mide por la unidad de detección, procesamiento de la señal y lectura. En algunos equipos la muestra está antes que el selector de longitud de onda



Configuración para medidas de fluorescencia. Aquí se requieren dos selectores de longitud de onda para seleccionar las correspondientes a la excitación y la emisión. La fuente de radiación incide en la muestra y la radiación emitida se mide generalmente a ángulos rectos para evitar la dispersión



Configuración para espectroscopia de emisión. Una fuente de energía térmica, como una llama o plasma, produce un vapor del analito que emite radiación la cual se aísla por el selector de longitudes de onda y se convierte en una señal eléctrica en el detector

INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

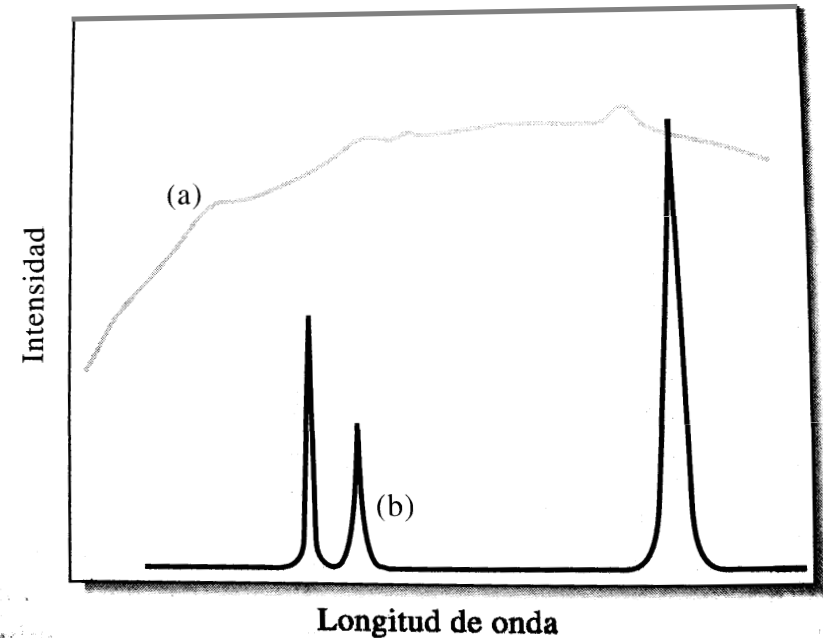
Fuentes espectroscópicas

Características

- 1) Debe generar un haz de radiación suficientemente energético
- 2) Debe ser estable a lo largo del tiempo

Pueden ser

- 1) **Continuas**, que emiten una radiación cuya intensidad varía de manera gradual en función de la longitud de onda
- 2) **Lineales**, que emiten un número limitado de líneas espectrales



Tipos de fuentes espectrales. El espectro de una fuente continua (a) es mucho más ancho que el de una fuente de líneas (b)

INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

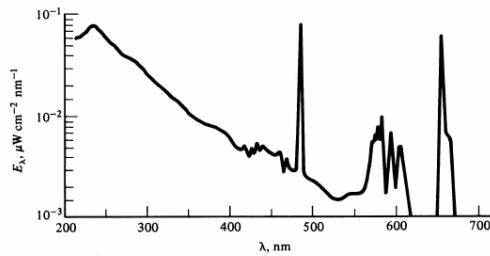
Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Fuentes espectroscópicas continuas

Fuentes continuas para espectroscopia óptica

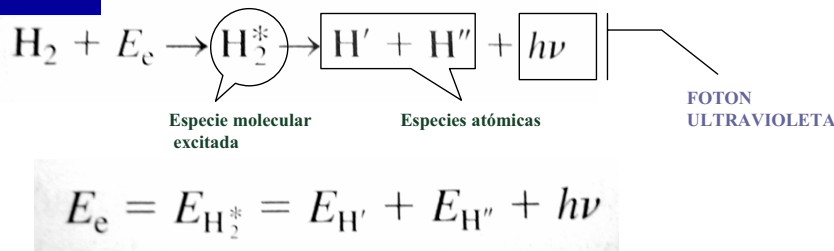
Fuente	Regiones de longitudes onda, nm	Tipo de espectroscopia
Lámparas de arco de xenón	250-600	Fluorescencia molecular
Lámparas H ₂ y D ₂	160-380	Absorción molecular UV
Lámpara de tungsteno/halógeno	240-2500	Absorción molecular UV/visible/IR cercano
Lámpara de tungsteno	350-2200	Absorción molecular visible/IR cercano
Lámpara de Nernst	400-20 000	Absorción molecular IR
Alambre de nicromo	750-20 000	Absorción molecular IR
Globar	1200-40 000	Absorción molecular IR

Espectroscopia UV. Lámpara de Deuterio (o hidrógeno a baja presión)



Irradiance (E_λ) from D₂ lamp measured by a detector at 25 cm

Excitación eléctrica de deuterio o hidrógeno a baja presión:



INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Fuentes espectroscópicas continuas

Espectroscopia visible. Lámpara de Tungsteno y de Tungsteno/Halógeno

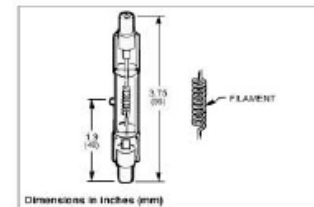
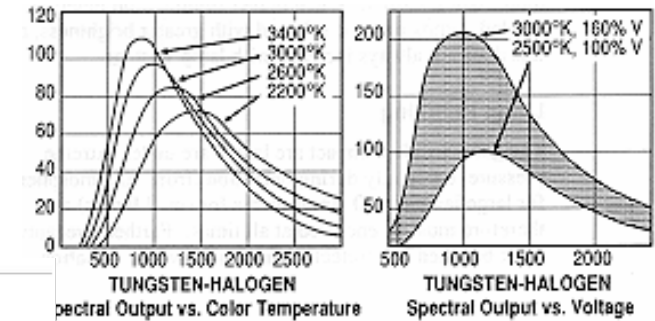
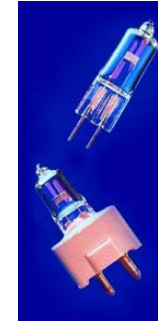
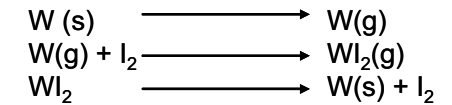
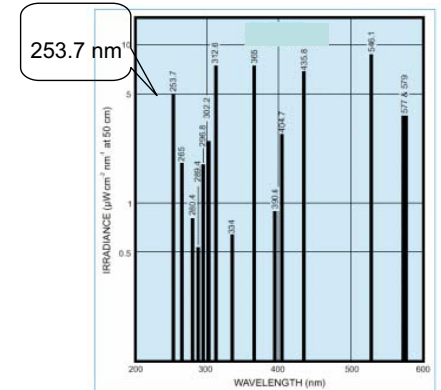


Fig. 5 6336 680 W QTH Lamp. The filament is shown on the right.



Fuentes espectroscópicas de líneas

Espectroscopia UV/visible. Lámpara de arco de mercurio a baja presión



Uso: Detectores de cromatografía de líquidos

Fig. 1 Irradiance, at 50 cm, from the 65130 Mercury High Power Spectral Line Lamp.

INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

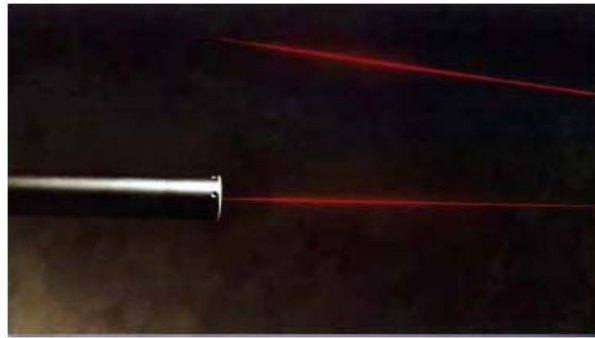
Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Fuentes monocromáticas de alta intensidad

Láseres

Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation

	Helio-Neon Gas	Argon Gas	Ruby Laser Q-switched solid state	Nd-YAG Laser Q-switched solid state	Semi-conductor	Semi-conductor
Wavelength	632.8 nm	514.5 nm	694.3 nm	1064 nm	820 nm	880 nm
Approx. Cost	£800	£25000	£15000	£35000	£200	£0.40



Common Laser System Configurations

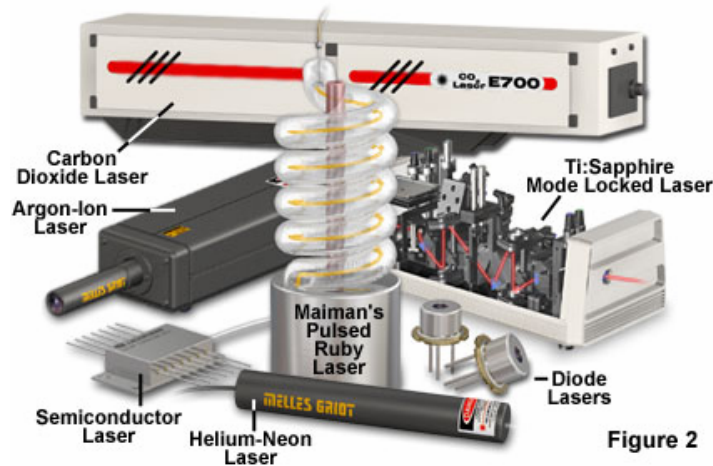


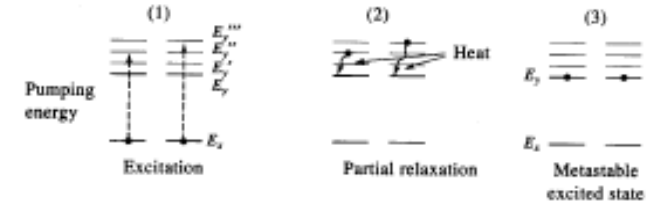
Figure 2

INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

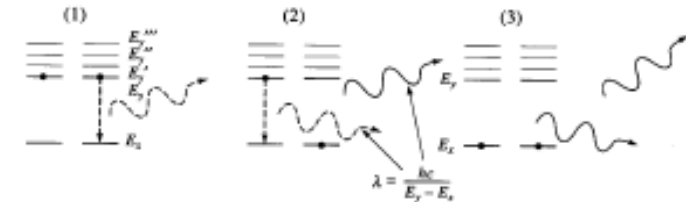
Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Fundamento del funcionamiento de un **láser**: emisión estimulada

Proceso de emisión espontáneo y estimulado

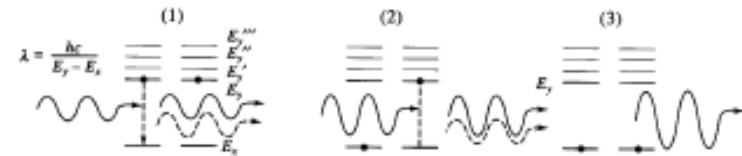


1) Bombeo por corriente eléctrica o fuente radiante



2) Emisión espontánea

Proceso al azar, los fotones emitidos difieren en dirección y fase, originan una radiación monocromática incoherente



3) Emisión estimulada

El fotón emitido se propaga en la misma dirección y está en fase con el fotón que desencadenó el proceso

INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Fundamento del funcionamiento de un **láser**: emisión estimulada

Proceso de emisión espontáneo y estimulado

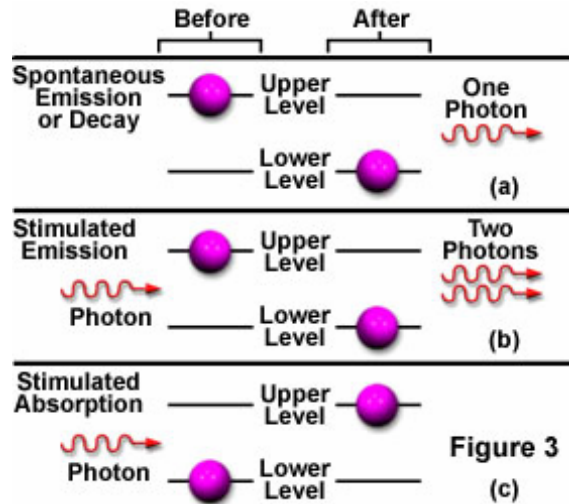
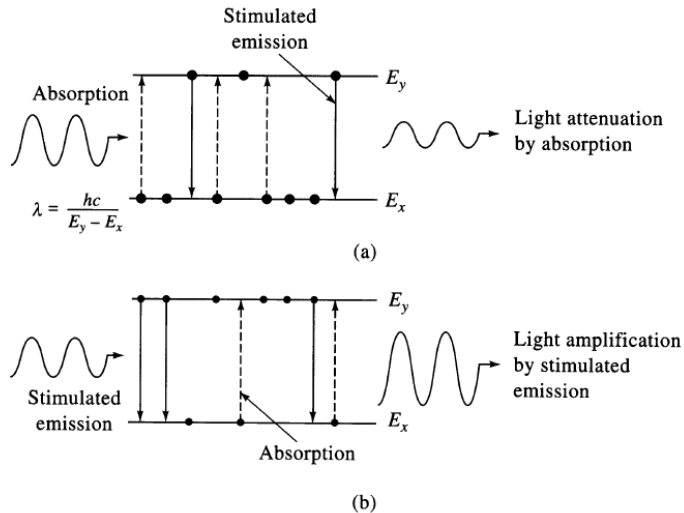


Figure 3

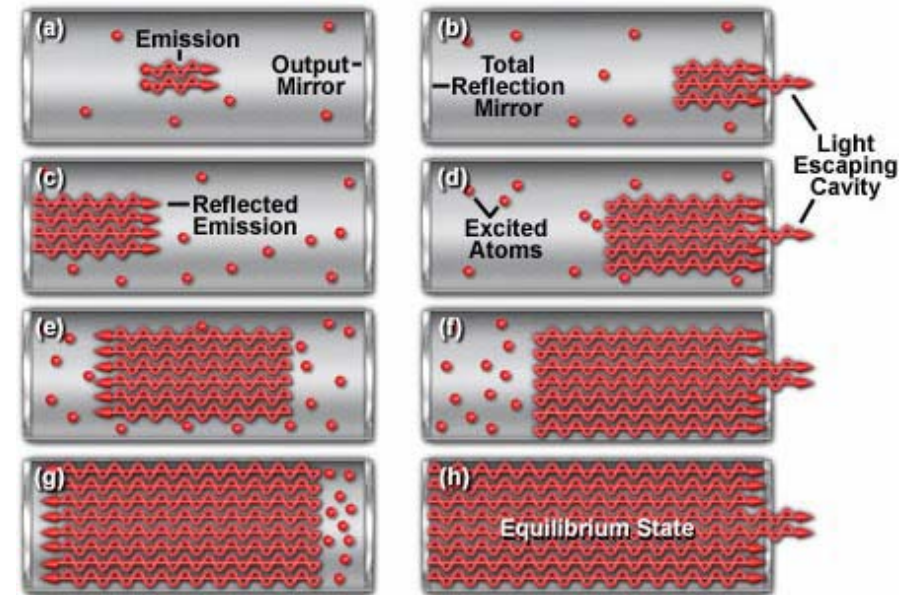
Pasaje de radiación a través de (a) población no invertida y (b) población invertida



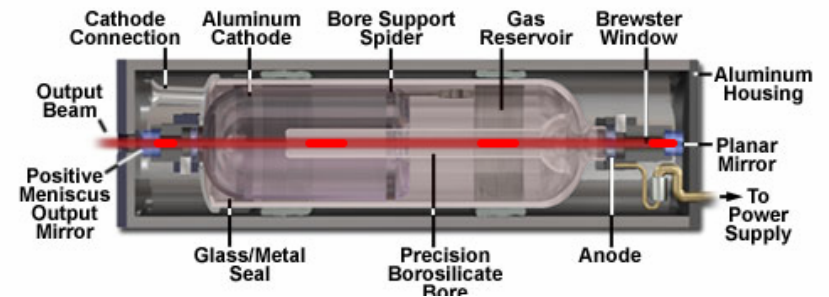
INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Fundamento del funcionamiento de un **láser**: emisión estimulada en la cavidad espejada del láser



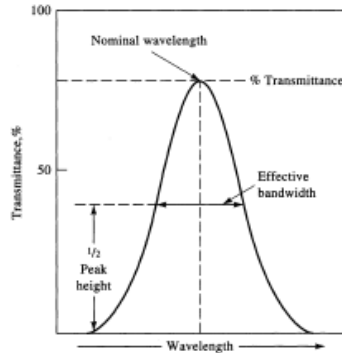
Láser de Helio-Neon



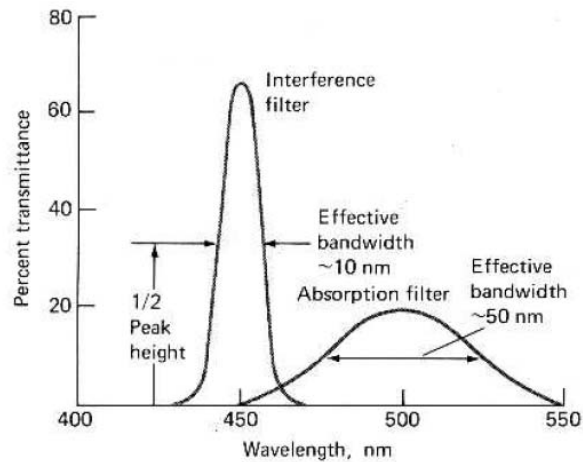
INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

Selectores de longitud de onda



FILTROS de absorción (VIS) y de interferencia (UV-VIS-IR)



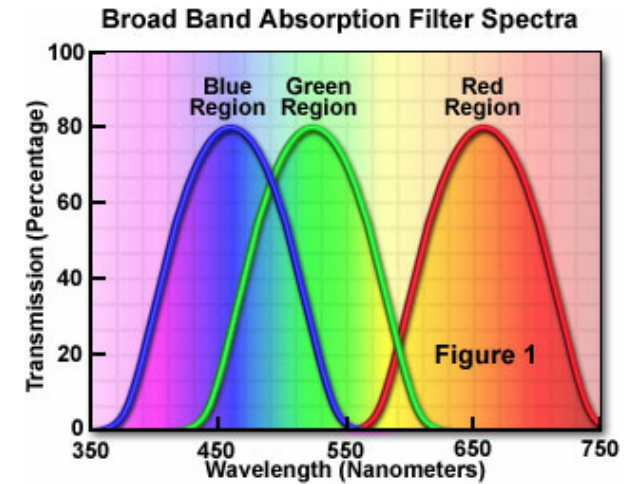
INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA ÓPTICA

Componentes de los equipos e instrumentos de espectroscopia óptica

FILTROS de absorción (VIS)

Absorben ciertas zonas del espectro selectivamente, dejando pasar la radiación que interesa. Tienen ancho de banda de 30 a 250 nm!!!!!!

- 1) Vidrio coloreado
- 2) Colorante entre dos placas de vidrio



FILTROS de corte

