



1227 AGO 2013.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

INSTITUTO DE INVESTIGACION DE INGENIERIA QUIMICA



Walter
111Q
05-08-2013
09.50h
244.

INFORME FINAL DE INVESTIGACION

“DETERMINACION DE BENZOATO POR ESPECTROFOTOMETRIA FTIR Y CROMATOGRAFIA EN BEBIDAS DE CONSUMO”

R.F. WALTER TAPIA CHACALTANA
Profesor Responsable

Resolución Rectoral No 1274-2011-R
Resolución No 215-2011-CFIQ
Resolución No -046-2011-IIIQ-FIQ

PERIODO DE EJECUCION : 01 DIC 2011 AL 31 DE AGO 2013
(21 MESES)

CALLAO - PERU
2013



INDICE

I.	RESUMEN ✓	05
II.	INTRODUCCION ✓	06
III.	MARCO TEORICO ✓	08
3.1.	ANTECEDENTES	
3.2.	ASPECTOS TEORICOS	11
	TECNICAS ANALITICAS	15
3.2.1.	CROMATOGRAFIA DE GAS	15
3.2.1.1.	GENERALIDADES	15
3.2.1.2.	FASE MOVIL	16
3.2.1.3.	FASE ESTACIONARIA	17
3.2.1.4.	SISTEMAS DE INYECCION	18
3.2.1.5.	JERINGAS	19
3.2.1.6.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TIEMPO DE ANALISIS Y LA RESOLUCION	22
3.2.1.7.	COLUMNAS	24
3.2.1.8.	DETECTOR	26
3.2.1.8.1.	DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA	26
3.2.1.8.2.	DETECTOR NPD ó DNF	27
3.2.2.	ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA	28

3.2.2.1. ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA	
CLASICA DE BARRIDO	29
3.2.2.2 ESPECTRO INFRARROJO DE TRANSFORMADA	
DE FOURIER	30
3.2.2.3. TECNICA POR REFLECTANCIA TOTAL	
ATENUADA (ATR)	33
3.2.2.4. MATERIALES DEL PRISMA	35
3.2.2.5. TECNICAS DE PREPARACION DE MUESTRA	
POR REFLECTANCIA DIFUSA	37
3.2.3. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	42
3.2.3.1. INTRODUCCION	43
3.2.3.2. PRINCIPIOS FISICOS	44
3.2.3.3. MODOS DE EXCITACIÓN ELECTRONICA	45
3.2.3.4. LEY DE LAMBERT & BEER	47
3.2.3.5. TIPOS DE ESPECTROFOTOMETROS	49
3.2.3.6. ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLECTANCIA	
DIFUSA (DRIF)	50
IV. MATERIALES Y METODOS /	52
4.1. DETERMINACION DEL BENZOATO POR CROMATOGRAFIA	
DE CAPA FINA.	52
4.1.3. SOLUCION DE REFERENCIA (PATRON)	52
4.1.4. PREPARACION DE LA FASE MOVIL	53
4.1.5. PREPARACION DE LA FASE ESTACIONARIA	53

4.1.7.	EXTRACCION DEL BENZOATO EN LAS MUESTRAS	53
4.2.	DETERMINACION DEL BENZOATO POR ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA	53
4.3.	DETERMINACION DEL BENZOATO POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	54
V.	RESULTADOS	54
5.1.	CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA	54
5.1.1.	REVELADORES CROMATOGRAFICOS	
5.1.2.	DETERMINACION DEL Rf y RRf	
5.2.	ESPECTROFOTOMETRIA U.V. - VISBLE	55
5.3.	ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA	55
VI.	DISCUSION	56
VII.	REFERENCIALES	58
VIII.	APENDICE	60
IX.	ANEXOS	67

I. RESUMEN

El Benzoato de sodio es un conservador, bacteriostático, fungostático en condiciones ácidas. Es el más ampliamente utilizado en alimentos ácidos como los aderezos para ensaladas (vinagre), bebidas carbonatadas (ácido carbónico), mermeladas, jugos de frutas, y condimentos. También se utiliza como conservante en medicamentos y cosméticos.

Aunque el ácido benzoico es un conservante más eficaz, el benzoato de sodio es más comúnmente utilizado como un aditivo alimentario ya que el ácido benzoico no se disuelve bien en agua¹⁰.

La concentración como conservante está limitada por las normas de la FDA en los EE.UU. al 0,1% en peso. El Programa Internacional sobre Seguridad Química no encontró efectos adversos en los seres humanos en dosis de 647-825 mg / kg de peso corporal por día¹¹

El presente trabajo de investigación, desde el punto de vista técnico busca contribuir a la identificación del benzoato de sodio en una bebida carbonatada.

Para este cometido se requiere del uso de una sustancia patrón y de los métodos analíticos como la cromatografía de gas, la Espectrofotometría Infrarroja y la Cromatografía de capa fina, de tal manera que permita demostrar inequívocamente la presencia de esta sustancia.

II. INTRODUCCION

El consumo del benzoato en una bebida gaseosa es abundante y diverso considerando que existen variadas bebidas que contienen esta sustancia; por lo que se puede identificar considerando los componentes de cada bebida gaseosa. También se puede identificar dicha sustancia en las bebidas incoloras, en las bebidas coloreadas y adicionalmente en otros productos alimentarios como jaleas, mermeladas etc.

Al ingresar a nuestro organismo al ser absorbidos se genera varios metabolitos además del benzoato inalterado.

Para ello se requiere de un estándar y de técnicas químicas e instrumentales necesarias para demostrar este tipo de sustancias.

Considerando estos aspectos el **Objetivo General** será Identificar una bebida para consumo humano por las técnicas analíticas de espectrofotometría FTIR y cromatografía.

Se presenta como **objetivos específicos** a los aspectos siguientes:

- a. Seleccionar las bebidas de consumo humano
- b. Analizar el benzoato por cromatografía una bebida
- c. Analizar el benzoato por espectrofotometría una bebida

Se plantea como **problema**, ¿Cómo identificaría los benzoatos por espectrofometría FTIR y cromatografía en bebidas de consumo?

La **importancia y justificación** del presente trabajo de investigación constituiría un aporte científico a las empresas de este rubro al garantizar la calidad de sus productos mediante los controles de calidad; y el presente trabajo de investigación al dar a conocer las técnicas de análisis químico como los espectrofotométrico FTIR y cromatográfico en un conservador alimentario como un benzoato, garantiza la calidad de estos productos, por lo que se justifica el presente proyecto de investigación.

III. MARCO TEORICO

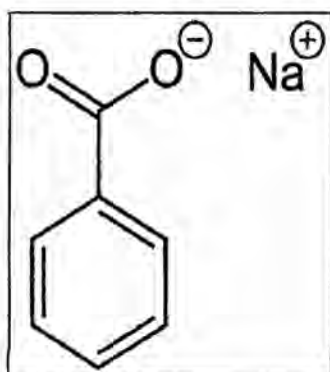
Las bebidas gaseosas son, una de las bebidas¹ más consumidas en todo el mundo, especialmente entre la población joven. El consumo comienza desde niños y se acrecienta durante la adolescencia.

Se las conoce en los diversos países con diferentes nombres como gaseosa, refresco, refresco con gas, soda o soft drink.

Estas bebidas son efervescentes, de sabor suigéneris, sin contenido de alcohol, sin embargo el consumo importante de gaseosas se asocia a una ingesta más baja de numerosas vitaminas, minerales y fibra.

Son un factor de riesgo para la salud² en general, ya que contribuyen, sin lugar a dudas, al sobrepeso y la obesidad, problemas dentales, renales y cardíacos entre otras enfermedades.

El benzoato de sodio es un⁵ conservador alimentario derivado de un ácido carboxílico aromático cuyo nombre IUQPAC es denominado: benzoato sódico, también denominado benzoato de sosa es una sal del ácido benzoico, de color blanco, cristalino y de aspecto gelatinoso o granulado.



3.1. ANTECEDENTES

El benzoato de sodio sal del ácido benzoico, cuando es tratada en medio ácido se obtiene el ácido benzoico.

El ácido benzoico, ácido carboxílico fue descubierto por el siglo XVI, y el trabajo pionero fue el año 1830 en el que mediante una variedad de experiencias basadas en la amígdalina, que se obtiene a partir de aceite de almendras amargas por Robiquet Pierre y Antoine Boutron-Charlard, dos químicos franceses, en el que se había producido benzaldehído pero fracasó en la elaboración de una interpretación adecuada de la estructura de la amígdalina que haría cuenta de ello, y por lo tanto se perdió la identificación del C₇H₅O radical benzoilo. Este último paso se logró algunos meses más tarde por Justus von Liebig y Friedrich Wohler, que determina la composición del ácido benzoico. Estos últimos también investigaron cómo se obtiene el ácido hipúrico al sufrir una biotransformación el ácido benzoico.

En 1875 Salkowski descubrió las propiedades antifúngicas del ácido benzoico. Este ácido fue utilizado durante mucho tiempo en la preservación de frutas como es el caso de la especie vegetal, "mora de los pantanos".

En la industria el ácido benzoico se produce comercialmente mediante la oxidación parcial de tolueno con oxígeno. El proceso es catalizado por naftenatos de cobalto o manganeso. El proceso utiliza materias primas baratas, obteniéndose un producto con un alto rendimiento, y es considerado como un buen método contribuyendo a preservar el medio ambiente.

A nivel del Laboratorio la obtención del ácido benzoico es barato y fácilmente disponible, por lo que la síntesis de laboratorio de ácido benzoico se practica principalmente por su valor pedagógico. Es una preparación universitaria común.

El ácido benzoico se puede purificar por recristalización a partir de agua, carbón activado, debido a su alta solubilidad en agua caliente y pobre solubilidad en agua fría.

Utilizando un método hidrolítico con los nitrilos y amidas, el benzonitrilo y la benzamida pueden ser hidrolizados a ácido benzoico o su base conjugada en condiciones ácidas o básicas.

OBTENCION A PARTIR DEL BENZALDEHIDO

El benzaldehído es una de las materias primas en la reacción de Cannizzaro, en el que se genera la misma cantidad de benzoato de sodio y alcohol bencílico; El alcohol bencílico puede ser separado por destilación y el benzoato de sodio es el conservador ..

3.2 ASPECTOS TEORICOS

Las bebidas gaseosas presentan en su composición química generalmente los siguientes componentes⁶: agua, azúcar, edulcorantes, ácidos (fosfórico, cítrico, málico, tartárico), cafeína, colorantes, saborizantes, dióxido de carbono, conservantes y sodio.

A continuación describiremos los componentes más importantes de las gaseosas y sus efectos individualmente:

- Agua: el agua es el mayor ingrediente y representa el 90% o más de las *bebidas gaseosas*. Típicamente utilizan agua destilada o filtrada por osmosis inversa o nano filtración, por tanto prácticamente se elimina su contenido de minerales
- Azúcar: las gaseosas contienen gran cantidad de azúcar refinada. Una lata de 325 ml de bebida no dietética, contiene alrededor de 33 gramos de azúcar, el equivalente a 11 cucharitas de té. Azúcar refinada se refiere a el azúcar blanca (sucrosa) o al almíbar de maíz con alta fructosa. La alta ingesta de

azúcar produce problemas dentales y aumenta el riesgo de sufrir de diabetes, cardiopatías, obesidad, sobrepeso y osteoporosis entre otras enfermedades.

- **Edulcorantes artificiales:** las bebidas gaseosas dietéticas o de calorías reducidas contienen edulcorantes artificiales de bajas calorías. Entre ellos se destaca el aspartamo, acesulfamo-k y la sacarina.
- **Aspartamo (Nutrasweet/Equal):** es 200 veces más dulce que el azúcar, por eso se utiliza en poca cantidad para endulzar la gaseosa.
- **Acesulfamo-K (Sweet One):** es 100-200 veces más dulce que el azúcar, con un gusto residual un tanto amargo. De acuerdo a estudios, no se aconseja su consumo ya que diversos análisis en animales han mostrado su potencial carcinogénico..
- **Sacarina (Sweet'N Low/Sugar-Twin):** es un edulcorante no nutritivo que es 300 veces más dulce que el azúcar. Al igual que el acesulfamo, estudios en animales de experimentación han demostrado que superando ciertas dosis diarias este puede ser causa cáncer.
- **Ácidos:** la mayoría de las bebidas gaseosas contienen ácidos: cítrico, fosfórico, málico y tartárico. Estos ácidos proporcionan esa sensación refrescante y al mismo tiempo preserva la calidad y el dulzor de la bebida. El pH promedio de las bebidas gaseosas es de 2.4.

Ácido fosfórico: crea un medio ácido que mejora la absorción del dióxido de carbono, reduciendo la presión que genera el dióxido de carbono y permitiendo así el embotellamiento. El ácido fosfórico tiene un sabor amargo

que es compensado con el agregado de azúcar. Está relacionado con la pérdida de calcio.

Ácido cítrico: es un acidulante usado para complementar sabores frutados en las bebidas. Mantiene los niveles de pH bajos, impidiendo el crecimiento de organismos. Es uno de los ácidos más erosivos para los dientes. Hoy en día, el ácido cítrico se obtiene industrialmente a partir del maíz y no de frutos cítricos. Contiene MSG (glutamato de sodio) que puede ocasionar, en algunas personas susceptibles, dolores de cabeza, dolor de pecho, náuseas, etc.

Cafeína: es una sustancia adictiva que mejora el sabor de la gaseosa. estimula el sistema nervioso y aumenta la frecuencia cardíaca. Cuando se consume cafeína, temporariamente aumenta la capacidad de atención y disminuye la fatiga. Junto con el azúcar genera una conducta adictiva que perjudica nuestra salud. En una lata de gaseosas de 355 ml hay aproximadamente 40 mg de cafeína

- Dióxido de carbono: responsable de las burbujas de la gaseosa, el dióxido de carbono se introduce al agua bajo presión. A medida que se agrega más dióxido de carbono, disminuye el pH, otorgando más acidez a la gaseosa y por lo tanto resulta más burbujeante. También se lo considera un conservante ya que genera un medio ácido que previene el crecimiento de microorganismos.

- **Conservantes:** son sustancias que preservan el gusto y el sabor y conservan la bebida por más tiempo, inhibiendo o deteniendo el crecimiento de microorganismo como hongos y bacterias. El exceso de preservativos puede causar asma, erupciones en la piel e hiperactividad. Los conservantes más usados son:

Dióxido de sulfuro (E220): es el más efectivo. Previene que las bebidas cítricas se oxiden y no cambien su color (que no viren al marrón). No puede ser usado en bebidas que son envasadas en contenedores de aluminio, ya que el contacto del dióxido de sulfuro con el aluminio produce sulfuro de hidrógeno (ácido sulfhídrico) que es altamente tóxico.

Benzoato de sodio (E211): es muy efectivo contra el crecimiento de levaduras y bacterias. Es difícil de disolver y tiene tendencia a precipitar en ácido benzoico. Bajo ciertas condiciones, reacciona con la vitamina C formando benceno, altamente tóxico para nuestro organismo por ser cancerígeno.

Sorbato de potasio (E202): es menos efectivo que el benzoato de sodio ante ciertas bacterias. Es más efectivo en un medio menos ácido comparado al benzoato de sodio. Es muy costoso y puede suprimir el sabor de la bebida. Se usa mayormente en bebidas a base de té.

Dicarbonato dimetil (E242): se considera una esterilizante frío. Se lo inyecta en el producto inmediatamente al ser embotellado, elimina microorganismos que pueden estar en los contenedores. Se lo usa mayormente en bebidas energizantes

- Los Saborizantes están presentes en todas las bebidas gaseosas. Se obtienen de fuentes naturales o artificiales. Se usan para proporcionar un aspecto más amplio de sabores.
- Los Colorantes permiten que el producto final sea visualmente más agradable. Corrige las variaciones naturales de color durante el procesado o el almacenamiento y da la característica propia de color de cada bebida. Tienen efectos adversos en niños con hiperactividad. Uno de los colorantes más utilizados es el color caramelo.
- Sodio: el contenido de sodio está en el rango de 20 mg-100 mg por cada 240 ml, dependiendo del fabricante y del sabor.

3.2. TECNICAS ANALITICAS

3.2.1. CROMATOGRAFIA DE GAS

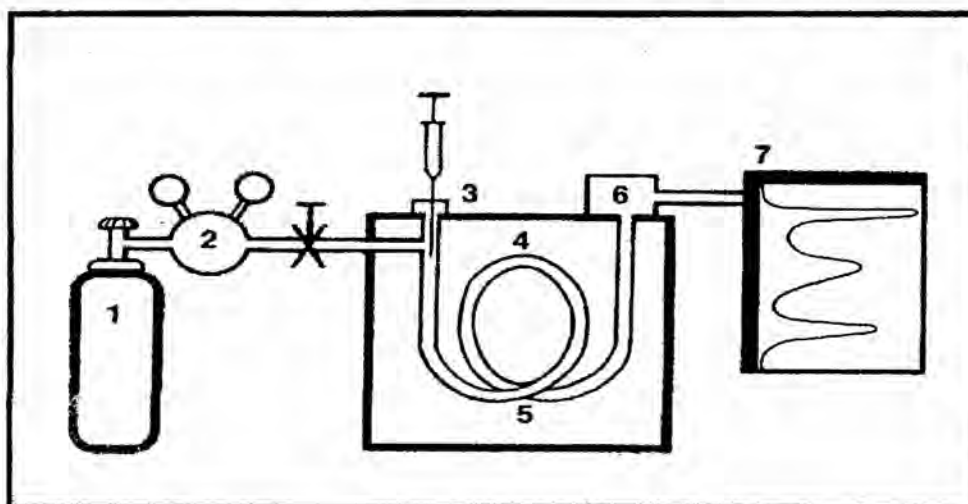
3.2.1.1. GENERALIDADES

La cromatografía de gas³ es una técnica analítica que consiste en un proceso de separación de dos ó más componentes y que mediante la introducción del analito a través del inyector a la columna permite su separación. Luego al ingresar al detector los componentes del analito serán reconocidos y finalmente ser registrados.

Para ingresar a este campo se indicará los aspectos fundamentales que se Indica a continuación.

FIG. N° 01

EQUIPO DE CROMATOGRAFIA DE GASES



Fuente : Cromatografía de gases. Harold M. McNair. O.E.A. 1981

- 1 : Gas portador
- 2 : Manómetro
- 3 : Inyector
- 4 : Columna

- 5 : Horno
- 6 : Detector
- 7 : Registrador

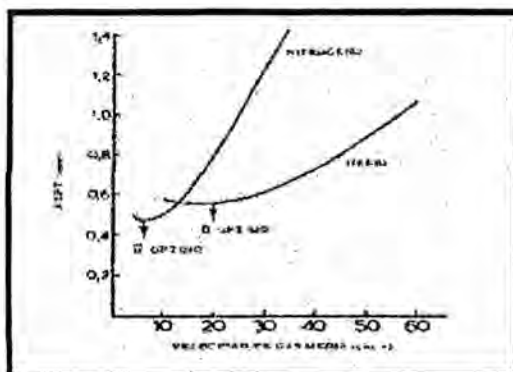
3.2.1.2. FASE MOVIL

La fase móvil es un gas y el objetivo es transportar los componentes volátiles de la muestra a través de la columna siendo el gas de naturaleza inerte.

El gas portador deberá ser el adecuado medio que influye en la separación de los analitos como en la velocidad del proceso analítico. Tenemos como gases portadores: al nitrógeno, al helio, al hidrógeno entre otros. Ver fig. N° 02

FIG. N° 02

VELOCIDAD DE GAS VS ALTURA EQUIVALENTE DE
UN PLATO TEORICO (AEPT)



Cuando se desea optimizar la velocidad del análisis se debe elegir un gas portador ligero como el He o el H₂. También es importante que el gas portador sea de alta pureza, puesto que las impurezas (oxígeno, agua) – pueden alterar químicamente la fase y por ende modificar el tiempo de retención.

Fuente : *Cromatografía de Gases.*
Mc Nair H. 1981

3.2.1.3. FASE ESTACIONARIA

Es una película delgada de material líquido que recubre la pared interna de una columna capilar o a las partículas de un soporte sólido en las columnas empacadas. Es aquí donde se produce la separación de los analitos, puesto que su función es la retención de estas sustancias en grados diferentes, contribuyendo a una buena separación de los analitos..

3.2.1.4. SISTEMA DE INYECCION

La muestra es colocada en el inyector por una micro jeringa atravesando el septum y la pasar el gas portador (fase móvil) caliente a esa zona hace ingresar a la muestra vaporizada para ser arrastradas hacia la columna.

En ciertos casos la muestra debe ser calentada permitiendo su rápida vaporización e ingreso a la columna. Dependiendo del tamaño de la muestra se utilizara una columna sin relleno (desde 1 ug) e incluso hasta nivel de gramos cuando estamos ante un nivel de escala preparativa

TABLA N° 02

TIPOS DE COLUMNA – VOLUMENES DE MUESTRA

TIPO DE COLUMNA	TAMAÑO DE MUESTRA	
	Gaseosa	Líquida
1. Preparativa 2.5 cm DE, 20% líquido	0.05 – 1 l	0,02 – 1 ml
4. Analítica regular 0,6 cm DE, 10% líquido	0,5 – 50 ml	0,02 – 20 ul
5. Alta eficiencia 0,3 cm DE, 2 % líquido	0,1 – 1 ml	0,01 – 2 ul*
6. Capilar (sin relleno) 0,15 cm DE, 5,0 um	0,1 – 10 ul	0,001 – 0,5 ul*

Fuente : Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981

- Estos tamaños de muestra, generalmente son obtenidos por determinados métodos de separación.

3.2.1.5. JERINGAS

Las partes básicas de una jeringa: aguja, el cilindro y el émbolo, en el cual la aguja es de acero inoxidable y está pegado con epóxido al cilindro. El cilindro es a base de vidrio de borosilicato y el émbolo también de acero inoxidable y que es ajustado al cilindro. La punta de la aguja es biselada a fin de penetrar con facilidad al diafragma.

3.2.1.5.1. Llenado de la jeringa

Al llenar la jeringa con el analito es necesario en primera instancia eliminar el aire, para ello se debe introducir la jeringa en el líquido y expulsar su contenido varias veces dentro del líquido. Cuando el líquido es viscoso éste deberá ser diluido con un solvente adecuado.

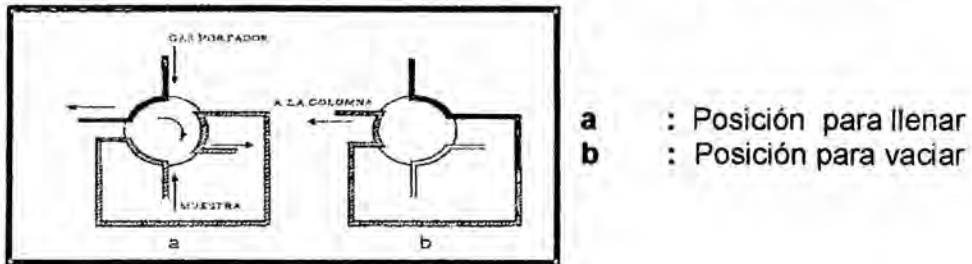
3.2.1.5.2. Método de limpiado de la jeringa

Si se utilizara analitos de alto punto de ebullición deberá lavarse la jeringa con un solvente volátil como por ejemplo el metanol, acetona etc. El émbolo se puede limpiar con papel suave y se vuelve a reinsertar. También se puede limpiar las jeringas en forma adecuada con un limpiador de jeringas.

3.2.1.5.3. Válvulas mostradoras de gases

Este método permite introducir una muestra gaseosa que es a base de una válvula de muestreo. En "a" la muestra es introducida en forma continua a través de un espiral hasta que se llene. El volumen de esta espiral se controla mediante la longitud y el diámetro del tubo de que está hecha. Se utilizan espirales desde 1 ul hasta 100 ml.

FIG. N° 03 : VALVULA MUESTREADORA DE GASES



Fuente : Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981

3.2.1.5.4. MUESTREO DE LIQUIDOS

Considerando el la alta capacidad expansiva de un líquido al sufrir una vaporización permite trabajar con tamaño de muestras sumamente pequeños, para ello se dispone de jeringas cuya capacidad es del orden de los microlitros. (se usa frecuentemente 5, 10, 25 ul).

FIGURA N° 04 : JERINGA HAMILTON

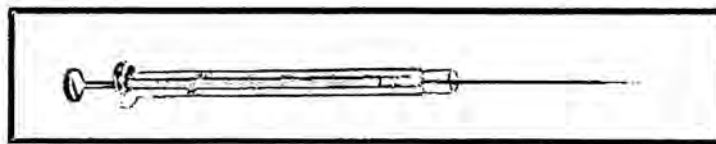
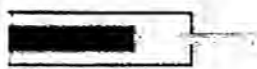


FIGURA N° 05 :

TERMINALES DE LAS JERINGAS



AGUJA FIJA



AGUJA REMOVIBLE A.



TEFLON ENGARZADO

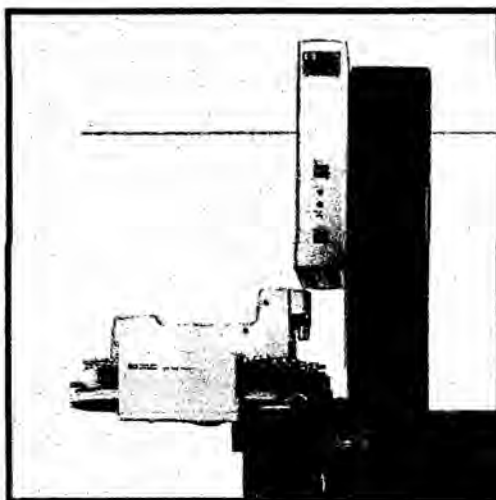
Fuente : Analytical columns and supplies . Hewlett Packard. 1994/1995

3.2.1.5.5.MUESTREO DE SÓLIDOS

Los analitos de naturaleza sólida al ser disueltos en un solvente adecuado son manipulados en la jeringa de inyección sea manual o automática. También existen mostradores automáticos.

FIG. N° 06

INYECTOR AUTOMATICO DE UN CROMATOGRAFODE GAS



*Fuente : Publication 43-5952-6968.
Hewlett Packard Company.1989*

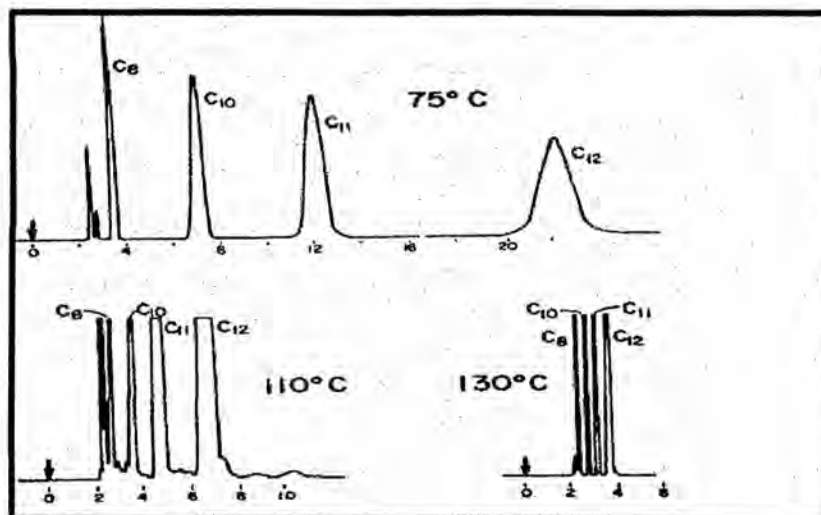
TEMPERATURA DE LA COLUMNA

La columna presenta un termostato que permite la separación de los analitos. La temperatura deberá ser lo necesariamente alta a fin de que se efectúe la separación en un tiempo adecuado y también debería ser lo suficientemente baja, permitiendo una mejor separación.

3.2.1.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TIEMPO DE ANALISIS Y LA RESOLUCION

En la mayoría de las muestras cuando la temperatura es más baja mejor es la separación (ver fig.07).

FIG. N° 07
MUESTRAS DE HIDROCARBURO EN
CONDICIONES SIMILARES



Fuente : *Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981*

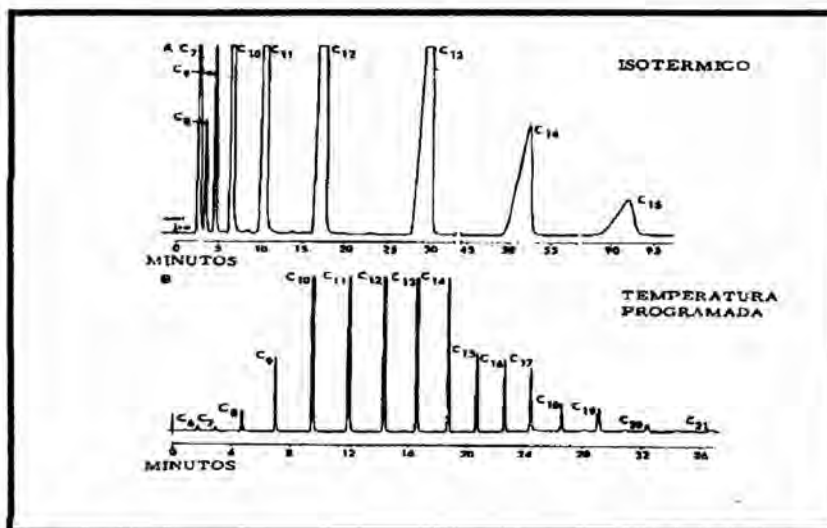
TEMPERATURA ISOTERMICA - TEMPERATURA PROGRAMADA

Temperatura isotérmica significa análisis cromatográfico a una sola temperatura y temperatura programada significa aumento lineal de la temperatura de la columna en el tiempo.

La temperatura isotérmica limita el análisis en cromatografía de gases a una muestra con punto de ebullición poco amplio, puesto que los picos iniciales que representan los componentes de bajo punto de ebullición y que al salir algunos picos se superponen, mientras que los picos de mayor punto de ebullición salen con retraso y como picos anchos o a veces salen eluidos en un análisis posterior como ruido .

FIG. N° 08

CROMATOGRAMA A TEMPERATURA ISOTERMICA Y A TEMPERATURA PROGRAMADA



Fuente : Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981

Con la temperatura programada, la temperatura inicial es baja entonces los picos iniciales presentan mejor resolución y al aumentar la temperatura cada componente de mayor punto de ebullición es eluido y sale más pronto y de mejor resolución, por consiguiente el tiempo total de análisis es más corto

TABLA N° 03

COMPARACION ENTRE LA TEMPERATURA ISOTERMICA Y LA TEMPERATURA PROGRAMADA

Aspecto	Isotérmica	Temperatura Programada
Intervalo de ebullición de la muestra	limitado hasta 100°C	80° - 400°C
Inyección de la muestra	debe ser rápida	no necesita ser rápida
Fase estacionaria	amplia selección	selección restringida
Pureza del gas portador	no crítica	esencial la alta pureza
Hornos separados para columna y detector	conveniente	esencial
Control de caudal	suficiente presión constante	se requiere regulador diferencial de caudal

Fuente : Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981

3.2.1.7. COLUMNAS

En la columna se realiza la separación de los analitos y es una parte muy importante en la cromatografía de gas.

FASE LIQUIDA

Es aquella que debe presentar la capacidad de disolución diferencial, permitiendo separar los analitos de una mezcla.

SOPORTE SOLIDO

El objetivo de este soporte es mantener una película delgada y uniforme de la fase líquida debiendo poseer ciertas cualidades que se indica a continuación:

- * Una amplia superficie de 1 a 20 m² /g.
- * Un diámetro de poro del orden de 10 micras o menos.
- * Con mínima capacidad de interacción química y adsorptiva a la muestra.
- * Partículas de tamaño homogéneo permitiendo un relleno eficiente.

Existe como materia prima para la mayoría de soportes de cromatografía de gases a la diatomita (tierra de diatomeas o kieselguhr) que es fundamentalmente sílice hidratada y microamorfa. Existen varios tipos de Chromosorb y que se indica a continuación :

- * Chromosorb A, (para escala preparativa)
- * Chromosorb G para compuestos polares.
- * Chromosorb P Principalmente para hidrocarburos
- * Chromosorb T principalmente para separar compuestos polares como el agua, halógenos, dióxido de azufre.
- * Chromosorb W para separar compuestos polares.

3.2.1.7.3. COLUMNAS CAPILARES o RELLENAS.

La columna rellena presenta un diámetro interno (D.I.) de 0,3 cm (líquido 10%) y 0,6 cm (líquido 5%), en cambio las capilares S.C.O.T. de 0,05 cm u otra de pared recubierta de 0,025 cm de D.I. El diámetro externo (DE) de las columnas analíticas estándar es de 0,3 y 0,6 cm. En las columnas capilares el DE es de 0,15 cm y el DI de 0,025 o 0,05 cm.

3.2.1.8. DETECTOR

Es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los analitos de una muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración.

Hay diversos tipos de detectores como: Detector de ionización de llama (FID), Detector de captura electrónica (ECD). Detector de fósforo, nitrógeno (NPD).

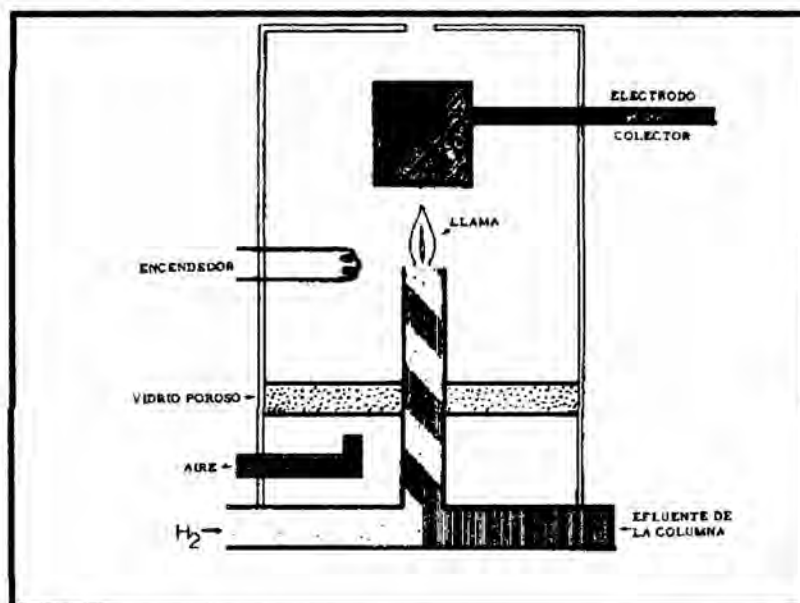
3.2.1.8.1. DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA (FID)

La conductividad eléctrica es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas. Cuando un componente orgánico entra en la llama, se quema y se forman partículas cargadas, cuyo aumento hace que fluya corriente. Esta corriente produce una señal que es amplificada y se observa como un pico sobre un registrador.

EL FID (fig. 09) responde a los compuestos orgánicos, pero existen sustancias que no dan respuesta como: el aire, el agua, gases inertes, monóxido de carbono, dióxido de carbono, disulfuro de carbono, anhídrido sulfuroso, monóxido de nitrógeno. El comportamiento del FID depende de la selección

apropiada de la velocidad del flujo gaseoso. Por lo general se utiliza una relación de relativa de flujo de 1:1:10 de hidrógeno/gas portador/aire.

FIG. N° 09 DETECTOR FID



Fuente : Fuente : Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981

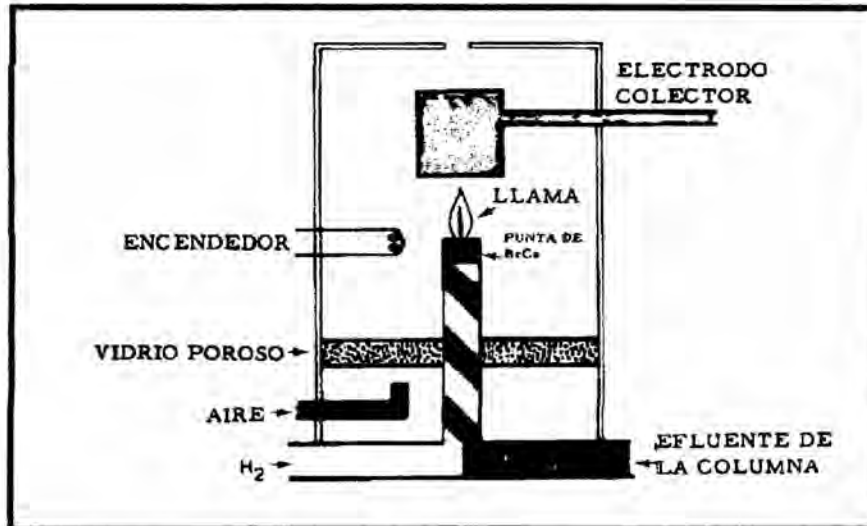
3.2.1.8.2. DETECTOR DE NITROGENO/FOSFORO (NPD) ó DNF

También denominado termoiónico en el que al añadirse en la punta una cantidad pequeña de bromuro de cesio y aumenta la selectividad con respecto a los compuestos fosforados y nitrogenados. (fig 10).

CARACTERISTICAS DE UN NPD

Determinación cuantitativa mínima	10 ⁻¹¹ (Parathion)
Respuesta	Muy selectiva para compuestos de nitrógeno y fósforo.
Linealidad	10 ⁻⁴
Estabilidad	Regular
Temperatura	300°C
Gas portador	Nitrógeno o helio

FIG. N° 10 DETECTOR NITROGENO/FOSFORO



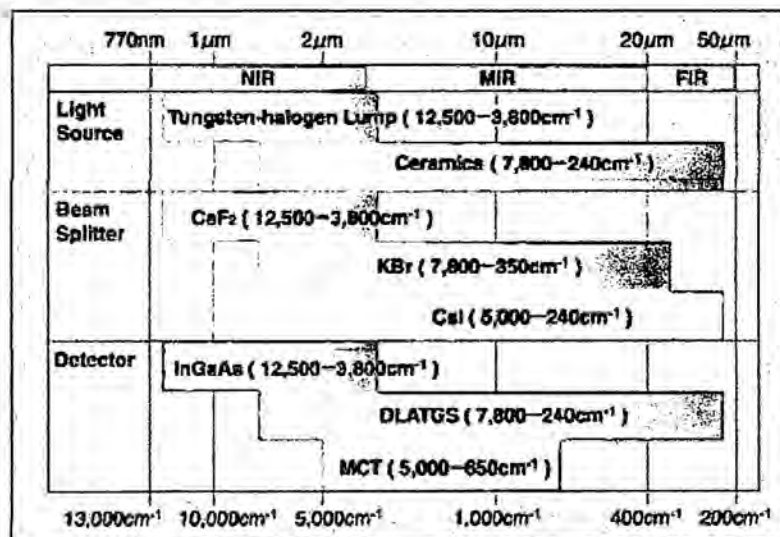
Fuente : *Cromatografía de Gases. Mc Nair H. 1981*

3.2.2. ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

GENERALIDADES

Actualmente se utilizan dos tipos de espectrofotómetros IR. Que si bien es cierto presentan el mismo fundamento,²³ósea utilizan una fuente de luz IR al emitir una radiación, que disminuye de intensidad al pasar a través de la muestra. La disminución está en función de la frecuencia y que a su vez corresponde a las vibraciones moleculares producidas por la excitación de la sustancia. La radiación residual se mide en un detector y se transforma electrónicamente en un espectro.

El detector más conocido es el DTGS, sulfato de triglicina deuterado.



Fuente : *Catalogo Shimadzu IR prestige – 21*
Columbia. U.S.A.

3.2.2.1. ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA CLÁSICA DE BARRIDO,

Opera de acuerdo al principio de doble haz, lo que nos indica un separador de haz (chopper) que divide la radiación continua de la fuente de luz en dos haces de luz de igual intensidad. Uno de los haces se dirige a través de la muestra, el otro sirve de radiación de referencia y atraviesa generalmente el aire, aunque en soluciones también puede atravesar una celda con solvente puro. Luego en el fotómetro se reunifican dichos haces. El monocromador, prisma o red de difracción descompone la radiación resultante, de tal forma que se puede registrar el espectro con el detector en función a la longitud de onda (barrido) por lo que se registra en una unidad de tiempo una única longitud de onda. Seguidamente de la

amplificación de la señal estas son registradas en un gráfico. Este espectro es registrado en aproximadamente diez minutos.

3.2.2.2. ESPECTRO INFRARROJO DE TRANSFORMADA DE FOURIER.-

Se basa en el registro simultáneo de todas las frecuencias del espectro IR. Y que se realiza en un período de tiempo sumamente corto en relación al método "Clásico de barrido"; esto es posible si la luz policromática de la fuente luminosa del IR con la misma intensidad y banda de frecuencias, se transforma en un interferograma, gracias al uso del interferómetro que significa que no es en función de la frecuencia sino del tiempo, ósea la transformación del dominio de **frecuencias**, al dominio del **tiempo**. Luego del paso de la radiación así obtenida a través de la muestra se vuelve a convertir el interferograma en un espectro mediante el recurso matemático, **la transformada de Fourier**.

Esta tecnología requiere del interferómetro de Michelson, en que la radiación se dirige al interferómetro a través de una placa de KBr o de CsI (recubierto con Ge) que funciona como separador de haz. La mitad del haz luminoso incide en un espejo fijo, la otra mitad incide sobre el espejo móvil, cuya distancia al espejo móvil se puede variar. Ambos espejos reflejan la radiación hacia la placa, donde se produce la interferencia. La señal producida es comparada con la

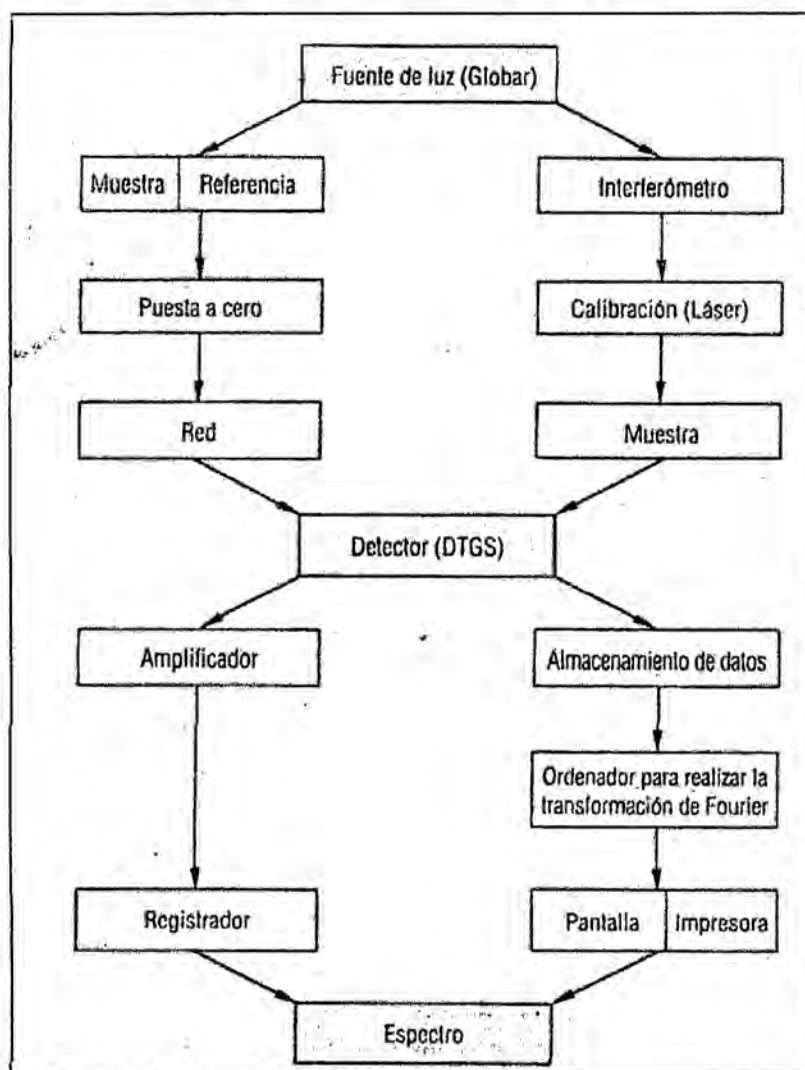
información obtenida con un emisor de radio de una determinada frecuencia de transmisión . Como la radiación IR es policromática, el interferograma obtenido es una superposición o suma de interferogramas correspondientes a todas las frecuencias individuales. Luego la radiación modulada atraviesa la muestra, donde se absorbe selectivamente de acuerdo a las vibraciones del analito. El detector registra la luz IR emergente como interferograma, transforma las señales ópticas en eléctricas y las almacena en la computadora y a través de la transformada de Fourier se obtiene el espectro IR para su interpretación.

Por lo que esta nueva técnica permite una serie de ventajas en relación a la técnica convencional de barrido :

1. Ahorro significativo de tiempo en los análisis.
2. Una mejor señal/ruido
3. Alta precisión en el número de bandas.

FIGURA N° 11

ESQUEMA BASICO DE UN IR DE RED (IZQ) y DE IR TF (DER)



Fuente : *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*
Hesse et al. 2005

3.2.2.3. TECNICA POR REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR).

El componente principal en los aparatos de ATR¹⁰ es el componente de reflectancia interna, que es generalmente un prisma o un material que transmita en el infrarrojo con un alto índice de refracción. La luz se focaliza en una de las caras del prisma y penetra en el material. La luz llega con un ángulo tal que impida la reflexión de la luz, de modo que llega a la interface con un ángulo predeterminado (q_i). Se denomina q_c al *ángulo crítico*. Donde q_c es:

$$q_c = \text{sen}^{-1}(n_2/n_1) \quad (n_1 > n_2)$$

n_2 : Índice de refracción de alrededor del medio

n_1 : Índice de refracción del material.

Cuando $q_c < q_i$ la reflexión interna ocurre de forma completa y se puede decir que la luz está atrapada en el interior del prisma; después de un número de reflexiones la luz deja el prisma. Aunque en alguna de estas reflexiones internas algo de luz puede salir del prisma al medio e interactuar con ese medio, de manera que se produce una atenuación de la luz reflejada cuando ocurre la absorción. Este es el mecanismo por el cual el ATR se utiliza para generar un espectro infrarrojo.

La longitud de paso efectiva para cada celda de ATR depende de la profundidad de penetración de cada reflexión (l) y del número de dichas reflexiones. La última es determinada por q_i y las dimensiones del prisma.

Vemos que hay una dependencia de la longitud de penetración con los índices de refracción lo que da lugar a diferencias entre el método de ATR y los espectros de transmisión.

Los valores más frecuentes para la longitud de paso están entre 0.25 y 4 mm, por lo tanto la celda de ATR equivale a una celda de transmisión con una longitud de paso muy pequeña.

Una paso importante para obtener un buen espectro de ATR es que debemos favorecer el contacto físico entre la muestra y el cristal. Aquellos materiales maleables o que estén húmedos o incluso líquidos dan muy buenos espectros. Sin embargo las muestras en forma de polvo o finamente divididas no dan buenos resultados.

En cualquier caso la intensidad absoluta del espectro dependerá del contacto entre la muestra y el cristal, por ello aparecerán problemas a la hora de la reproducibilidad, ya que es muy difícil

3.2.2.4. MATERIALES DEL PRISMA

La elección del material del prisma es crucial para el buen desarrollo del método. Se requiere uno que tenga un alto índice de refracción y el material debe ser inerte desde el punto de vista químico y que presente buenas propiedades mecánicas.

Para la mayoría de las aplicaciones la resistencia al agua es muy importante.

MUESTREO Y GEOMETRÍA DE LOS ACCESORIOS DE ATR.

SOLUCIONES.

Las soluciones deben ser preparadas usando una variación denominada *Reflectancia interna cilíndrica (CIR)* de cuya forma la celda toma el nombre de celda circular. El prisma presenta terminaciones cónicas y se monta de modo que la solución rodea al cristal. La luz se focaliza mediante lentes de modo que llegue a las terminaciones cónicas.

Estas celdas se usan para tamaños de muestra que van desde 5ml a 120ml, usando para ello un prisma pequeño.

Esta técnica (CIR) que presenta una longitud de paso muy pequeña es utilizada muy frecuentemente para soluciones acuosas.

PASTAS Y SEMI-SÓLIDOS.

Estas muestras se examinan utilizando lo que se denomina *ATR horizontal* (**HATR**). El prisma es ahora un paralelogramo con espejos en las terminaciones. La muestra se extiende sobre el cristal y se obtiene el espectro. La muestra se quita fácilmente con un trapo.

La muestra se fija al prisma por una serie de láminas. Hay algunos instrumentos poseen un mayor número de láminas para aumentar la presión de la muestra sobre el prisma y a la vez mejorar el contacto. Esto es usado generalmente para muestras finamente divididas.

VARIACIONES EN LA LONGITUD DE PENETRACIÓN.

Como la longitud de penetración depende del ángulo de incidencia(q_i), podemos variar la esta distancia variando el ángulo.

Esto se puede llevar a cabo con un accesorio que nos permite variar el ángulo entre 30 y 60 grados. Para ello se utilizan espejos situados verticalmente de hay que también se denomine *ATR vertical*.

DESVENTAJAS.

Aunque estas técnicas son muy flexibles presentan una serie de desventajas:

- a) No tienen mucho éxito con muestras en forma de polvo.
- b) Es muy sensible al contacto eficiente muestra-cristal, lo que da lugar a que no se utilice ampliamente para trabajos cuantitativos.

3.2.2.5. TECNICAS DE PREPARACION DE MUESTRAS POR REFLECTANCIA DIFUSA.

La técnica de reflectancia difusa se ha convertido en una de las más utilizadas para el análisis de sólidos y de muestra divididas en forma de partículas, y es generalmente no requiere preparación de muestra o esta es mínima. Sin embargo el espectro producido puede exhibir picos inusuales cuando se compara con los espectros de transmisión. En ciertos casos el espectro de puede estar tan distorsionado que sea imposible determinar los componentes de la muestra. Para comprender estos fenómenos es necesario conocer en que se basa esta técnica.

Consideremos un rayo de luz que llega a la superficie de un medio particular .

En la interface las caras de los cristales están puestas al azar, luego hay un gran número de ángulos de incidencia del rato con

las caras. Algunos rayos llegaran con un ángulo tal que se produzca la reflexión en la superficie (r_1); lo más significativo es que este rayo no tiene interacción con la muestra. Otro rayo (r_2) llegará con un ángulo tal que se produzca la refracción y por tanto entre en el cristalito. Este rayo puede salir o que se produzcan sucesivas refracciones en el interior. En general el rayo será reflectado y refractado en varios cristales antes de salir del sólido.

El ángulo de salida puede tomar cualquier valor. Son estos rayos los que interaccionan con la muestra y contienen por lo tanto información espectral. Es necesario tener en cuenta que aunque el ángulo de salida es igual al ángulo de entrada, esto es solo cuando la superficie son perpendiculares al rayo, sino se produce esto no tiene porqué cumplirse esta ley.

Esta mezcla de rayos que se reflejan y otros que se refractan no puede ser separados, y siempre se va a producir. Por lo tanto la energía que mide el detector será la suma la suma de los energía de los rayos que han sido reflejados y aquellos que si han interaccionado con la materia.

La presencia del efecto especular que es producido por la reflexión tiene importantes consecuencias en el espectro, y aunque se cuente con filtros no siempre se puede discriminar los rayos

reflejados de los refractados. Aunque en ciertas circunstancias se puede mejorar la información espectral.

La reflectancia difusa difiere de la transmisión en que la luz reflejada en la superficie no vuelve a incidir de nuevo y la información espectral depende de la dispersión de la luz por la muestra.

DESVENTAJAS.

Además de los problemas de la reflexión en la superficie nos encontramos con otros problemas:

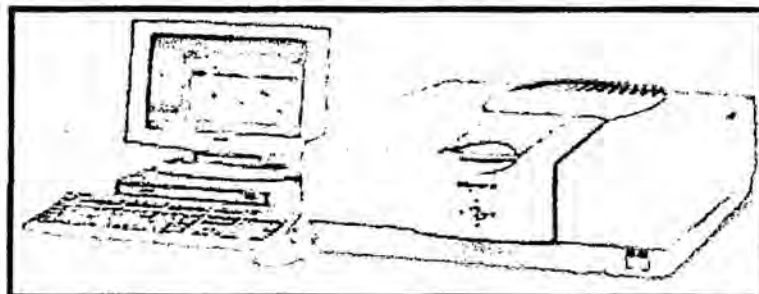
Esta limitada principalmente a muestra en polvo.

-Si la muestra contiene agua y debido al calentamiento producido por el rayo de luz infrarrojo, esta se puede evaporar dando lugar a vapor de agua que causa fuertes interferencias en el espectro.

El llenado de la celda es poco reproducible sobre todo cuando se quiere trabajar en análisis cuantitativo.

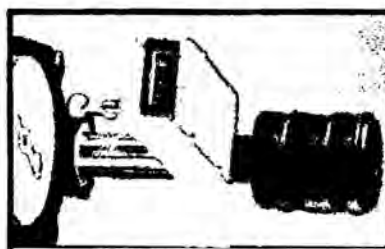
FIGURA N° 12

**ESPECTROFOTOMETRO IR – FT
PRESTIGE 21**



***Fuente: Catalogo Shimadzu IR
Prestige – 21 Columbia. U.S.A.***

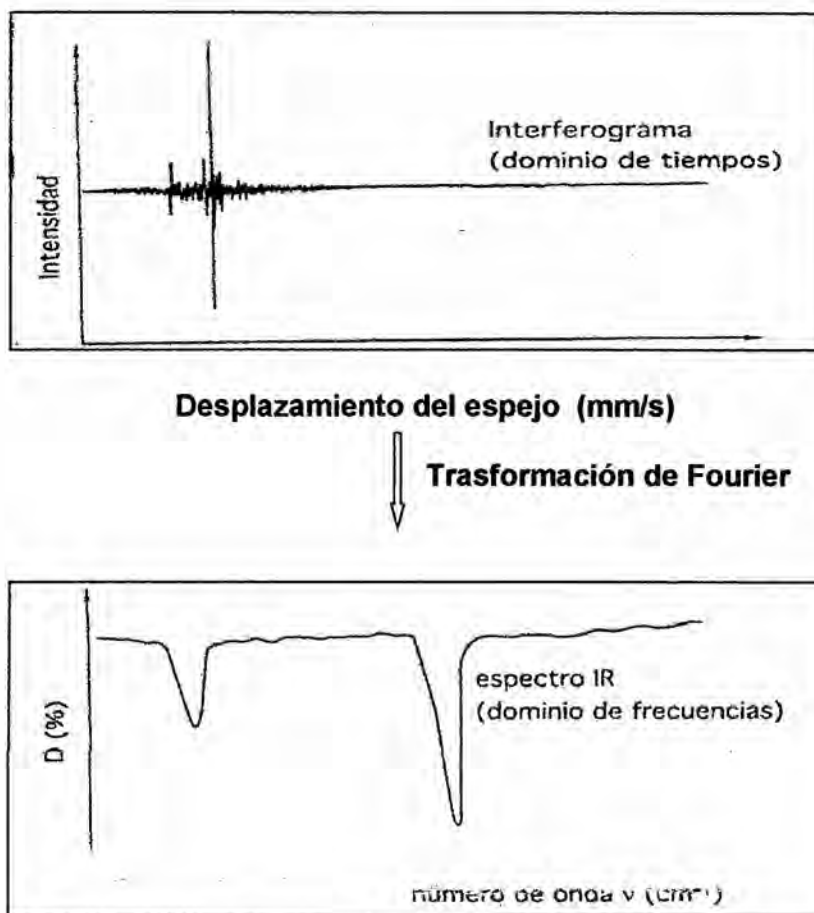
**MICROSAMPLING HORIZONTAL
INTERNAL/SPECULAR
REFLECTANCE SYSTEM (HATR)**



***Fuente : Catalogo Shimadzu IR
Prestige – 21 Columbia. U.S.A.***

FIGURA N° 13

**DEL INTERFEROGRAMA AL ESPECTRO IR
POR TRANSFORMADA DE FOURIER**



Fuente : *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*
Hesse et al. 2005

3.2.3 ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La **espectroscopia ultravioleta-visible**⁴ o **espectrofotometría ultravioleta-visible** (UV/VIS) es una espectroscopia de emisión de fotones. La espectrofotometría utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380nm y 780nm.

La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca diversas transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos conjugados.

Se utiliza extensivamente en laboratorios de química y bioquímica para determinar pequeñas cantidades de cierta sustancia, como las trazas de metales en aleaciones o la concentración de cierto medicamento que puede llegar a ciertas partes del cuerpo.

INTRODUCCIÓN

Una diferencia obvia entre ciertos compuestos es su color. Así, la quinona es amarilla; la clorofila es verde; los 2,4-derivados del dinitrofenilhidrazona de aldehídos y de cetonas se extienden en color de amarillo brillante a de color rojo oscuro, dependiendo de la conjugación del enlace doble; y la aspirina es descolorida.

- Longitud de onda: se define como la distancia entre los picos adyacentes y puede ser medida en metros, centímetros, o nanómetros.
- Frecuencia: es el número de ondas por ciclos usualmente sus unidades están dadas en Hertz que son ciclos por segundos (Hz).

La luminiscencia ocurre debido a la emisión de luz por una sustancia determinada y esto ocurre cuando un electrón regresa a su estado inicial después de haber sido excitado y libera una energía como un fotón. Podemos encontrar tres tipos de nombres para la espectroscopia de luminiscencia, para diferentes técnicas:

- Espectroscopia de fluorescencia molecular
- Espectroscopia de fosforescencia molecular
- Espectroscopia de quimiluminiscencia

PRINCIPIOS FÍSICOS

El principio de la **espectroscopia ultravioleta-visible** involucra la absorción de radiación ultravioleta visible por una molécula, causando la promoción de un electrón un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm.

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV, como es el caso del β -caroteno.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada **linealmente** con la concentración de la especie absorbente según la ley de Lambert & Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absortividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente).

MODOS DE EXCITACIÓN ELECTRÓNICA

Cuando un fotón UV-Visible de energía adecuada incide en una especie absorbente, un electrón es promovido desde su estado fundamental a un estado electrónico excitado. En absorción UV-Visible, pueden observarse las distintas transiciones electrónicas:

Transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$

$\lambda < 150$ nm. Este tipo de transiciones se dan sobre todo en hidrocarburos que únicamente poseen enlaces σ C-H o C-C. La energía requerida para que tenga lugar esta transición es relativamente grande, perteneciente a la región espectral denominada ultravioleta de vacío.

Transición $n \rightarrow \sigma^*$

λ entre 150-200 nm. Correspondientes a hidrocarburos que poseen átomos con pares de electrones no compartidos (electrones de no enlace). La energía necesaria para que se produzca esta transición sigue siendo alta (aunque menor que en las $\sigma \rightarrow \sigma^*$) perteneciendo éstas a la región espectral UV Lejano.

Transición $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$

El λ está entre 200-700 nm. La mayoría de las aplicaciones de espectroscopia UV-Visible están basadas en transiciones que ocurren en esta zona. Se requiere que las especies participantes aporten un sistema de electrones π (grupos cromóforos:

compuestos con insaturaciones, sistemas aromáticos multicíclicos, etc.). Las energías de excitación en las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ son medianamente altas, correspondiendo a la región UV Lejano y Próximo, mientras que las $n \rightarrow \pi^*$ son considerablemente menores, correspondiendo a la región visible del espectro. En espectroscopia UV-Vis se irradia con luz de energía conocida suficiente como para provocar transiciones electrónicas, es decir promover un electrón desde un orbital de baja energía a uno vacante de alta energía.

Transiciones electrónicas posibles entre orbitales n: orbital que contiene par de electrones no compartidos (ejemplo en : O, N, Cl)

Las transiciones más favorecidas son entre el orbital ocupado de energía más alta (**HOMO**) y el orbital desocupado de energía más baja (**LUMO**)

el espectrómetro UV-Vis registra las longitudes de onda donde se registra absorción y cuantifica la absorción.

El espectro se registra como absorbancia (A) Vs. longitud de onda (Å), las bandas del espectro UV son anchas por que incluyen la estructura fina de transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía.

EL ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante. El vidrio, que parece ser completamente transparente, absorbe longitudes de onda que pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del IR. La absorción de las radiaciones UV, visibles e IR depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. El color de las sustancias se debe a que absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y sólo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbida. Esta espectrofotometría utiliza radiaciones del campo UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro. Se rige por una ley muy importante: la ecuación de Lambert & Beer.

Ley de Lambert & Beer

Una expresión para la ecuación de Beer-Lambert es la siguiente:

$$\frac{I_t}{I_0} = e^{-klc}$$

Dónde:

I_t es el rango de luz captado por el tubo de fotolorimetría,

I_0 es el rango de luz que sale del tubo de fotolorimetría y que va a llegar a la celda fotoeléctrica donde es captada y medida k es la capacidad de captación del haz del campo electromagnético,

l es la longitud del tubo de fotocolorimetría, en cm.

c es la concentración de la muestra ya ubicada en el tubo de fotocolorimetría.

La ley de Beer permite cuantificar la concentración de una muestra por UV, también puede ser expresada de la siguiente manera:

$$A = \epsilon Cl$$

donde:

A es la Absorbancia

ϵ es el Coeficiente de extinción (Característico de cada sustancia).

l es el Largo del paso de la cuba (cm).

C es la Concentración (moles/l).

La zona de longitudes de onda que se registra en un espectro UV-Vis es de entre 200 y 800 nm. En esta zona no absorben dobles ni triples enlaces aislados .

Sólo van absorber enlaces π conjugados y heteroátomos con pares de electrones no compartidos (O, N), como los grupos cromóforos.

Características del sistema

- Las muestras en solución se ponen en una pequeña celda de Si.
- Se utilizan dos lámparas: una de H o deuterio para la región UV, y una de W / halógeno para la región visible
- Se utiliza también una celda de referencia que contiene sólo solvente.

- La luz pasa simultáneamente por la celda de muestra y la celda de referencia.
- El espectrómetro compara la luz que pasa por la muestra con la que pasa por la celda de referencia.
- La radiación transmitida es detectada y el espectrómetro obtiene el espectro de absorción al barrer la longitud de onda de la luz.

3.2.3.5. TIPOS DE ESPECTROFOTÓMETROS

Espectrofotómetro de doble haz: es aquel que cuenta con dos compartimientos para celdas de muestra que le permite medir simultáneamente la cantidad de energía radiante absorbida por una matriz (blanco) y la energía absorbida por la muestra compuesta por la matriz y la especie de interés. **Espectrofotómetro de haz simple:** cuenta con un único compartimiento de celda con lo cual se debe realizar la medida de absorción del "blanco" para poder registrar un cero (o referencia) y luego medir la absorción de la muestra.

Consideraciones generales

La espectroscopia ultravioleta-visible es la más limitada para la información de compuestos. Los compuestos que tengan un cromóforo o instauraciones son visibles en esta región. Un cromóforo es cualquier grupo de átomos que absorben luz independientemente de que presente color o no, aunque también puede presentar un grupo auxocromo que es el que amplía la conjugación de un cromóforo mediante la compartición de electrones de no enlace.

La máxima absorción se debe a la presencia de cromóforos en una molécula. Este tipo de espectroscopia sirve principalmente para el análisis de compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos (α y β) insaturados.

Para el análisis de catalizadores suele utilizarse una variante de esta espectroscopia llamada **espectroscopia de reflectancia difusa**.

3.2.3.6. ESPECTROSCOPIA DE “REFLECTANCIA DIFUSA” (DRIFTS)

La **reflectancia difusa** tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión como se muestra en la figura, y predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débiles absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación a la longitud de onda.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL DRIFTS

Ventajas

- Preparación mínima muestra.
- Posibilidad análisis mayoría materiales no reflectores, incluyendo materiales muy opacos o poco absorbentes.
- Análisis de superficies irregulares y materiales duros.
- Alta sensibilidad (pocos ppm).

Desventajas

Además de los problemas de la reflexión en la superficie nos encontramos con otros problemas:

- Está limitada principalmente a muestra en polvo.
- Si la muestra contiene agua y debido al calentamiento producido por el rayo de luz infrarrojo, ésta se puede evaporar dando lugar a vapor de agua que causa fuertes interferencias en el espectro.
- El llenado de la celda es poco reproducible sobre todo cuando se quiere trabajar en análisis cuantitativo.

Espectrofotómetro Ultravioleta Visible



*Fuente : Catálogo Varian
Cia. Merck Lima - Perú*

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. DETERMINACION DEL BENZOATOPOR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

4.1.1. FUNDAMENTO

Separación de los analitos mediante la extracción liquido – liquido, luego su detección por comparación con el Standard correspondiente.

4.1.2.MATERIALES y EQUIPO

- | | |
|---|------------------|
| * Aro | * Fiola de 10 ml |
| * Tanque cromatográfico | * Pipeta x 1 ml |
| * Embudos | * Viales |
| * Papel de filtro | * Regla |
| * Pera de decantación | * Capilares |
| * Soporte universal | * Fiola de 50 ml |
| * Vasos x 250 ml | * Pulverizador |
| * Balón de nitrógeno | * Balanza |
| * Placas cromatográficas de 20 x 20 cm. | |
| * Equipo de cromatografía de capa fina | |

4.1.3. SOLUCION DE REFERENCIA (PATRON)

Preparada a una concentración de 1 mg/ml de una solución de Benzoato de sodio..

4.1.4. PREPARACION DE LA FASE MOVIL

Se han utilizado un sistema de fase móvil con la finalidad de elegir el solvente adecuado que permita obtener una mejor resolución de los analitos a investigar.

* **Fase movil :**

Cloroformo : Acetona

(60) (40)

4.1.5. PREPARACION DE LA FASE ESTACIONARIA

Se han utilizado láminas de silicagel HF254 Merckde 20 x 20 cm, para luego ser activadas mediante el calor a una temperatura de 60°C.

4.1.6. REVELADOR CROMATOGRAFICO

* Reactivo de Tricloruro de fierro.- A base de una solución al(5%)

4.1.7. EXTRACCION DEL BENZOATOEN LAS MUESTRAS

La muestra de una bebida carbonatada es calentada y luego es concentrada por medio del calor y el residuo es depositado el residuo en un vial para la siembra correspondiente.

4.2. DETERMINACION DEL BENZOATO POR ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

Se utilizó el Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier modelo Prestige 21, mediante la técnica ATR. Luego de la extracción del analito y homogenizando se procede a la lectura del mismo.

4.2. DETERMINACION DEL BENZOATO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV – VISIBLE

Se utilizó el Espectrofotómetro marca Varian, modelo Cary 50, en la sustancia patrón de benzoato de sodio y del extracto de una bebida gaseosa.

V. RESULTADOS

Se analizaron las muestras del extracto de La bebida gaseosa y del benzoato de sodio Standard mediante los métodos de cromatografía de capa fina, espectrofotometría visible, además del método analítico de Espectrofotometría Infrarroja, y con estos resultados en conjunto se demostró que la muestra contiene el benzoato, conforme está expresado en los resultados que se indican a continuación :

5.1. CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

5.1.1. REVELADORES CROMOGENICOS.-

Con el reactivo de tricloruro de fierro se obtuvieron manchas de color azulino.

5.1.2 DETERMINACION DEL Rf Y RRF

Por este método se establece que el extracto de la bebida gaseosa en relación al Standard benzoato de sodio , y en base al Rf del Standard, se determina la presencia de este analito, con un Rf de 0.74.en St. Y 0.745 en la muestra de bebida (ver Apéndice N° 01)

5.2. ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE

Se determinó que el extracto del benzoato se encontró mediante la comparación con el standard con un λ máximo de 397.9 (Ver Apéndice N° 03)

5.3. ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJO

Se procedió a la identificación del benzoato mediante el uso de un Espectrofotómetro Infrarrojo con transformada de Fourier, observándose que dicha molécula presenta diversos picos y entre los más importantes tenemos: a 1647 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , a 630 cm^{-1} (Apéndice N° 05).

VI. DISCUSION

- 6.1. La metodología utilizada ha permitido en el presente trabajo de investigación la identificación del benzoato procedente del extracto de la bebida gaseosa al compararse con su Standard respectivo..
- 6.2 Dada la compleja composición de la muestra ha sido necesario realizar el tratamiento de extracción del principio activo.
- 6.3 Una vez separados los componentes propios de una bebida carbonatada, se procedió a la separación del analito utilizando el método cromatográfico de capa fina así como su identificación, también la identificación por el método de espectrofotometría visible y el método de Espectrofotometría Infrarroja con Transformada de Fourier
- 6.4.La identificación de los analitos por el método de cromatografía de capa fina ha sido mediante el reactivos de tricloruro de fierro..
- 6.5. La identificación del Benzoato por el método de espectrofotometría visible ha sido mediante la determinación del lambda máximo.
- 6.6 Mediante el método de Espectrofotometría Infrarrojo, con la técnica ATR se verificó que se trata de la estructura

del compuesto carboxílico aromático a través de la interpretación de sus grupos funcionales fundamentales.

- 6.7** Asimismo con este resultado también es posible su aplicación en la industria y si se tratara de una adulteración sería aplicada en Criminalística.

VII. REFERENCIALES

1. BEDFORD, PG. CLARKE, E.G. Experimental benzoic acid poisoning in the cat. Vet Rec, 2004. 90pp. 53-58.
2. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel Bindu Nair (2001). "Final Report on the Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate". Int J Tox (20 (Suppl. 3)): pp. 23-50.
3. JENTOFT.F.C. Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft.2004
4. KREBS HA, WIGGINS D, STUBBS M Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. Biochem J.1983.214: pp. 657-663.
5. LÓPEZ, P.E. Determinación del ácido benzoico y benzoato de sodio en bebidas no carbonatadas. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 48 p.
6. LUECK E. Antimicrobial Food Additives. New York : Germany. Springer Verlag. Heildelberg.. 1° edition.1980.
7. RUBINSON, K. RUBINSON, J. Análisis instrumental. Madrid : Ed. Prentice Hall. 1° edición.2001.

8. SMITH& REYNARD, Pharmacology. N.Y. : Saunders, 3° Edition, 1992.
9. UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, N.Y. The united States Pharmacopeia. USP XXI.
10. THE NATIONAL FORMULARY NF-XVI. USA. USP Convention, 1990.

VIII. APENDICE

1. APENDICE N° 01: CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.-
Rf. DE LOS STANDARD Y DE LA MUESTRA
2. APENDICE N° 02 : ESPECTROFOTOMETRO VARIAN – CARY 50
3. APENDICE N° 03 : ESPECTROGRAMA DE BENZOATO SODIO
STANDARD
4. APENDICE N° 04 : ESPECTROFOTOMETRO INFRARROJO PRESTIGE
21 (CON EL ACCESORIO ATR)
5. APENDICE N° 05 : ESPECTROGRAMA INFRARROJO FTIR PRESTIGE
DEL BENZOATO DE SODIO
6. APENDICE N° 06: ESPECTROGRAMA INFRARROJO FTIR BENZOATO
(MUESTRA EXTRACTO EN BEBIDA GASEOSA)

APENDICE Nº 01

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

Rf. DE LOS STANDARD Y DE LA MUESTRA

SOLUCIONES	FASE MOVIL	
	Rf	RRf
Benzoato sodio St	0,75	1,00
Benzoato (extracto)	0,745	99,3

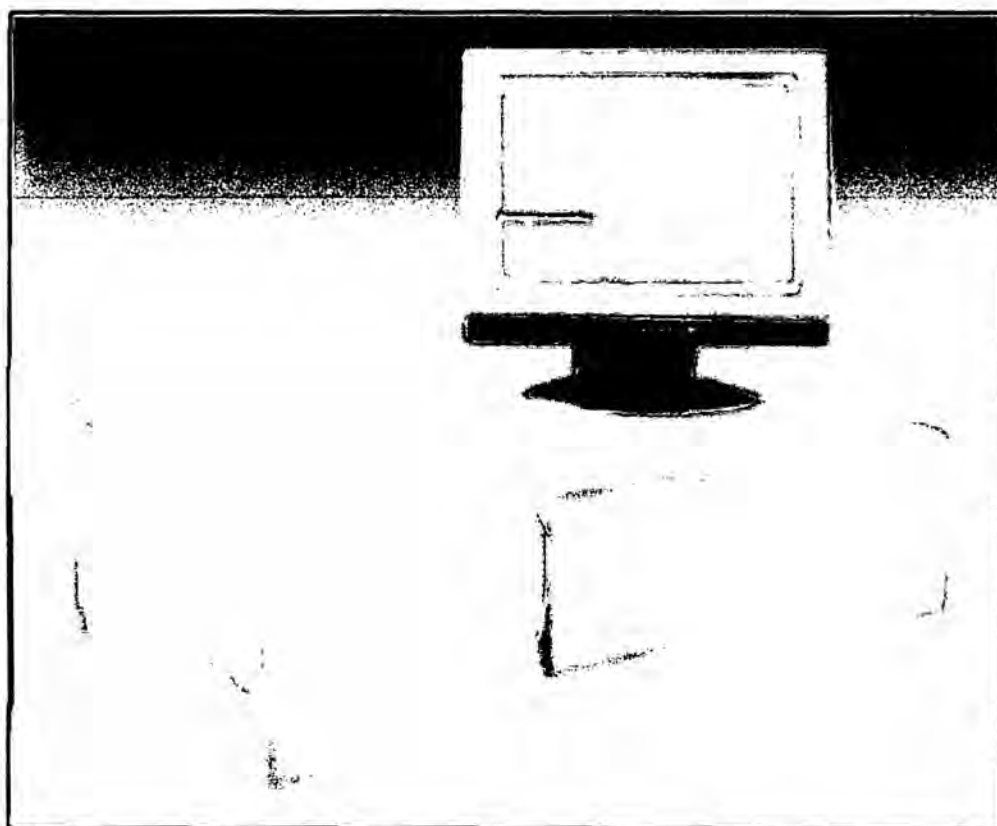
*Fuente : Q.F. WALTER TAPIA CHACALTANA
LABORATORIOS QUIMICA – FIQ – UNAC - 2012*

Rf : Distancia entre la parte céntrica de la mancha del analito y la línea de base.

RRf : Correlación entre un Rf patrón y el Rf. del analito a examinar.

APENDICE N° 02

ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE VARIAN

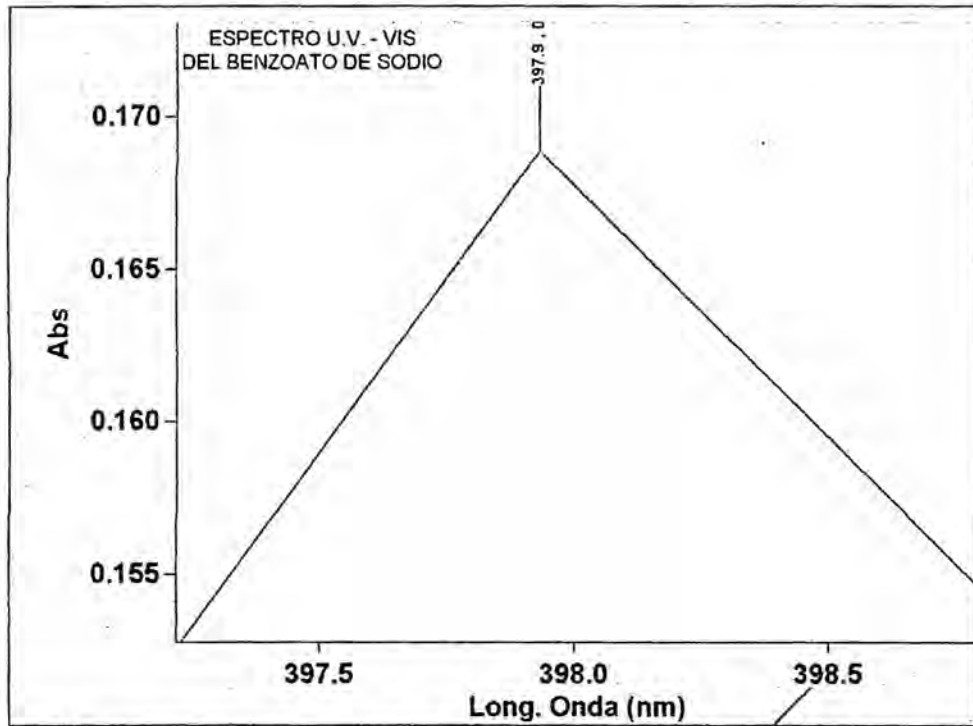


Fuente : *Elaboración propia*
Lab – FIQ- UNAC - 2012

APENDICE N° 03

ESPECTROGRAMA DEL BENZOATOSODIO STANDARD

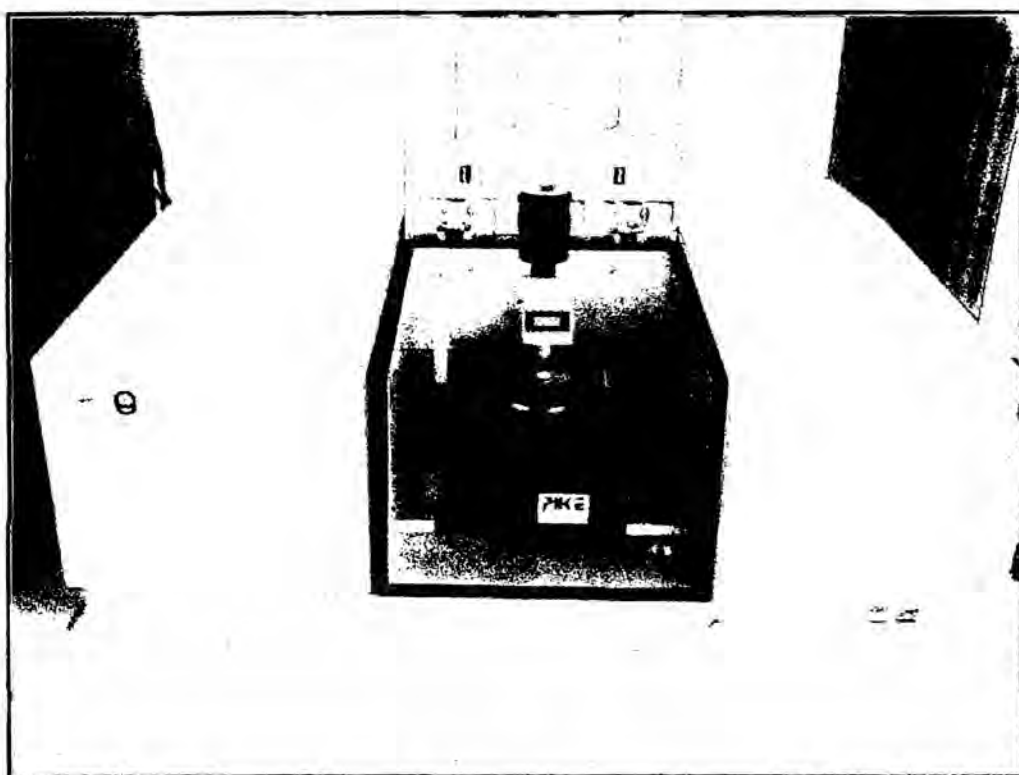
ESPECTRO U.V. - VIS DEL BENZOATO DE SODIO



Fuente : *Elaboración propia*
LAB. FIQ - UNAC 2013

APENDICE N ° 04

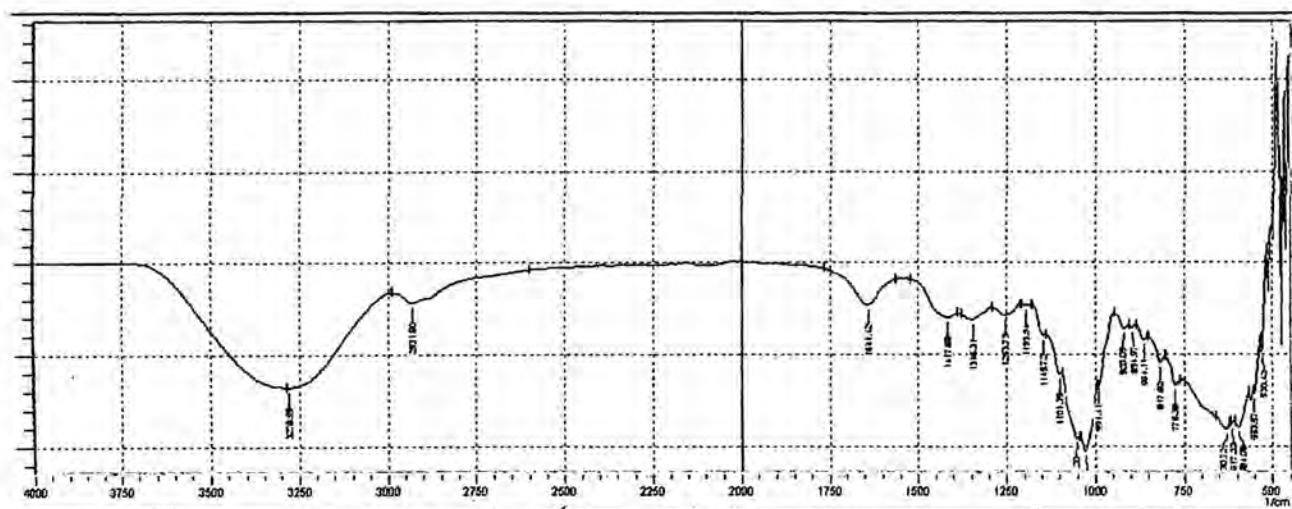
ESPECTROFOTOMETRO INFRARROJO PRESTIGE 21
(CON EL ACCESORIO ATR)



Fuente : *Elaboración propia.*
UNAC - FIQ-2009

APENDICE N° 05

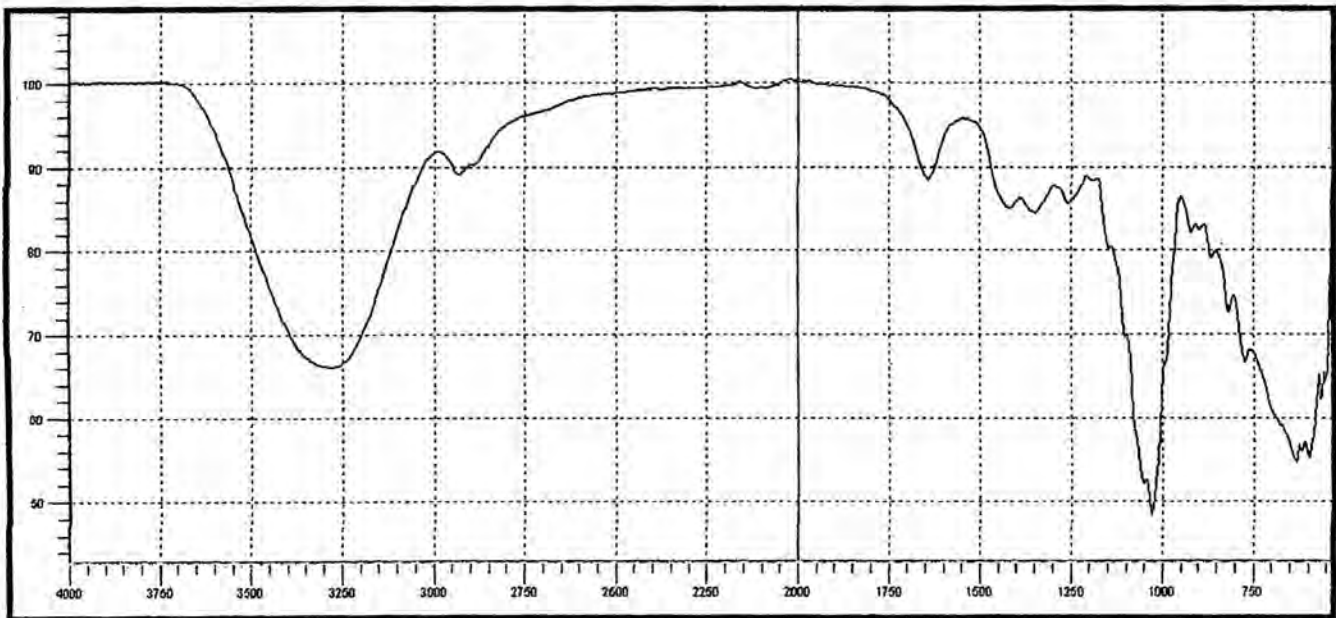
ESPECTRO INFRARROJO FTIR DEL BENZOATO DE SODIO



Fuente: Elaboración propia.
Laboratorio FIQ-UNAC -2013

APENDICE N° 06

ESPECTROGRAMA INFRARROJO FTIR BENZOATO
(MUESTRA EXTRACTO ENBEBIDA GASEOSA)



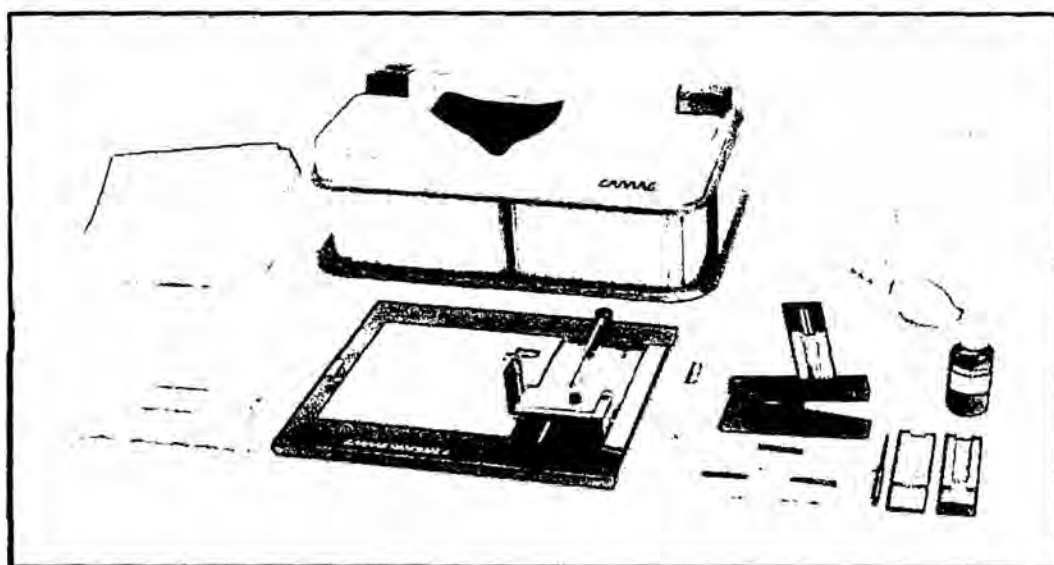
Fuente : Elaboración propia
Lab. - FIQ -UNAC

IX. ANEXOS

1. ANEXO N° 01
EQUIPO DE CROMATOLOGRAFIA DE CAPA FINA
2. ANEXO N° 02
BIOTRANSFORMACION DEL BENZOATO
3. ANEXO N° 03
EQUIPO DE CROMATOLOGRAFIA DE GAS CON INYECTOR
AUTOMATICO

ANEXO N° 01

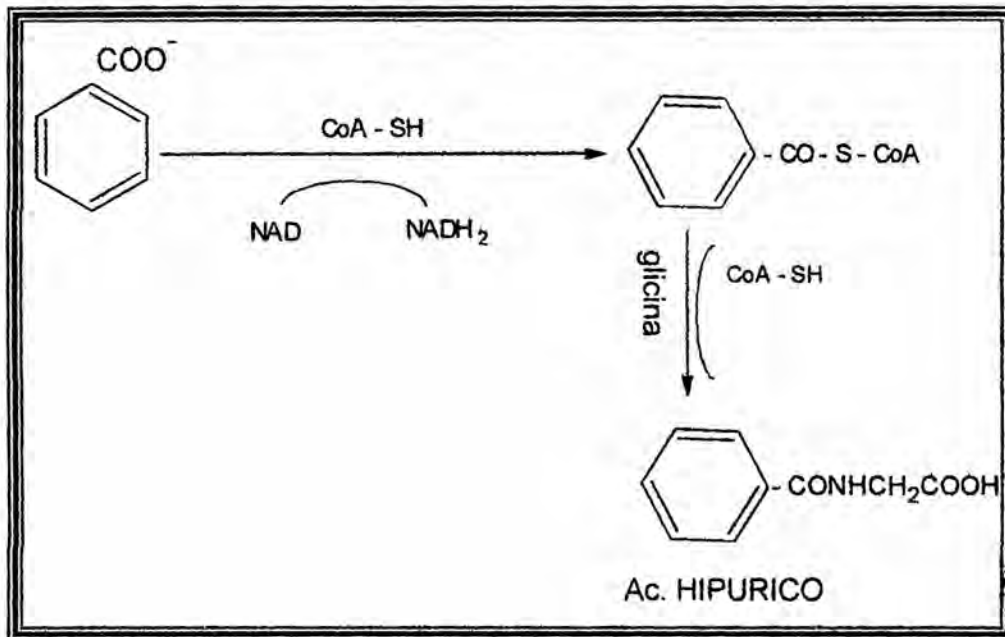
EQUIPO DE CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA



Fuente : Planar Thin Layer Chromatography, Camag. 2003

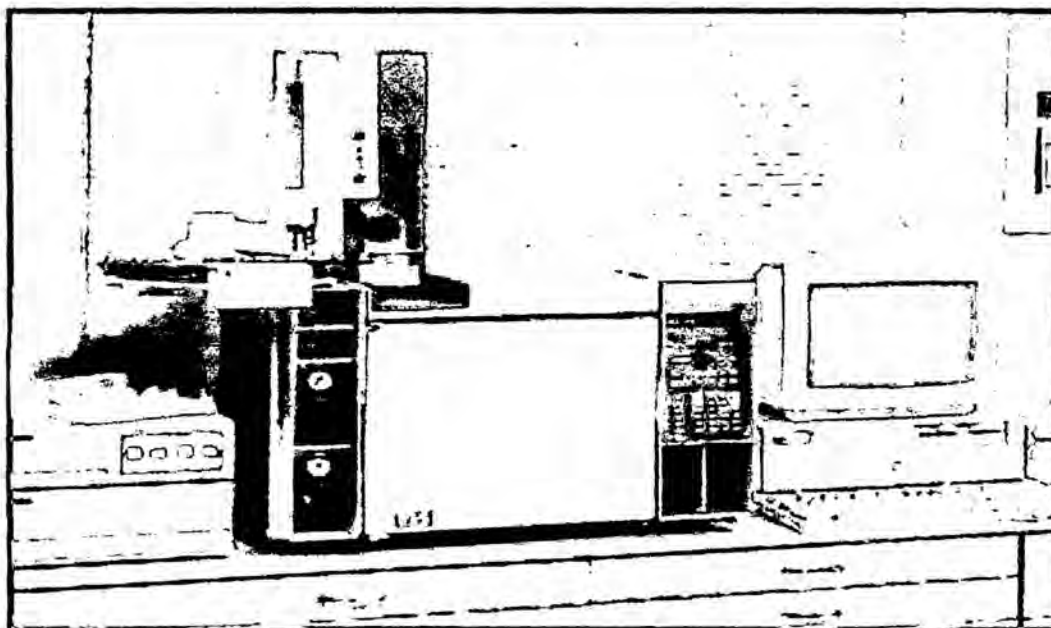
ANEXO N° 02

BIOTRANSFORMACION DEL BENZOATO



Fuente: Universidad de los Andes.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

ANEXO N° 03
EQUIPO DE CROMATOGRAFIA DE GAS
CON INYECTOR AUTOMATICO



*Fuente : Publication 43-5952-6968. Hewlett Packard Company.
1989*