



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

***CUADERNILLO DE PROPUESTAS TEÓRICAS DE PRÁCTICAS EXPERIMENTALES CON
APLICACIÓN A LA MATRIZ SARGAZO***

Producto correspondiente al Proyecto PAPIME (Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación)

**“Sargazo: Contribución de la Química Analítica desde la Docencia e Investigación Formativa”
(CLAVE PE210820)**

Nota: El documento no ha sido aun revisado para su implementación experimental

Cd. Universitaria, Coyoacán, CDMX
Marzo 2022

Autores:

María Teresa de Jesús Rodríguez Salazar

Minerva Monroy Barreto

Julio César Aguilar Cordero

Ariana Janai Morales Velázquez

Arlett Gisela Gómez Carrasco

Analaura Skladal Méndez

Caterin Gutiérrez Sánchez

Eric Delgadillo Mendoza

Esperanza Elizabeth Mendoza Solís

Ilse Pamela Bernal España

Leyre Coppelia Cañibe García

María Fernanda Leyvas Acosta

Stephany Ramírez Arenas

Información: mtjrs.papime2020@gmail.com / mtjrs@quimica.unam.mx



La primera propuesta está elaborada para su aplicación en la Unidad Temática No. 3 (Análisis Gravimétrico) de las asignaturas

es I) Analítica Experimental I

- a) Clave 1507, 5º Semestre de las Carreras Química Farmacéutico-Biológica (QFB) y Química de Alimentos (QA)
- b) Clave 1602, 6º Semestre de la Carrera de Química

Las prácticas No. 2-8 están elaboradas para su aplicación en las siguientes asignaturas:

II) Analítica Experimental II

- a) Clave 1607, 6º Semestre de las Carreras Química Farmacéutico-Biológica (QFB) y Química de Alimentos (QA)
- b) Clave 1700, 7º Semestre de la Carrera de Química

Se presentan las propuestas en el orden de las Unidades Temáticas:

- 1) Métodos Electroquímicos de Análisis
- 2) Métodos Espectroscópicos Cuantitativos
- 3) Métodos Espectroscópicos Moleculares
- 4) Métodos Cromatográficos

INDICE:	PÁGINA
1) Determinación de cenizas en alga <i>Wakame</i> Leyvas-Acosta, MF; Rodríguez-Salazar, MTJ	6
2) Determinación de cobre por voltamperometría hidrodinámica en algas comestibles comerciales del género <i>Sargassum</i> Mendoza-Solís, EE; Aguilar-Cordero, JC; Rodríguez-Salazar, MTJ; Monroy-Barreto, M	11
3) Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-Vis Skladal-Méndez, A; Cañibe-García, LC; Rodríguez-Salazar, MTJ (La adaptación audiovisual se encuentra en el enlace: https://drive.google.com/drive/folders/1lwHjabv3PajXDzt3bcp6cC7SFIIA_uMV)	18
4) Cuantificación de polifenoles totales en tejido de alga marina <i>Sargassum spp.</i> Mediante Espectrofotometría UV-Visible Gutiérrez-Sánchez, C; Rodríguez-Salazar, MTJ	24
5) Análisis de pigmentos algales en muestras de macroalgas (<i>Sargassum</i>) Bernal-España, IP; Rodríguez-Salazar, MTJ	32
6) Determinación de antioxidantes en Sargazo utilizando un método Espectrofotométrico Gómez-Carrasco, AG; Arenas-Ramírez, S; Monroy-Barreto, M; Rodríguez-Salazar, MTJ (La propuesta publicada se encuentra en el enlace: https://amyd.quimica.unam.mx/mod/url/view.php?id=13843)	39
7) Análisis cuantitativo de hierro contenido en sargazo Delgadillo-Mendoza, E.; Rodríguez-Salazar, MTJ	44
8) Determinación de Ácidos Grasos Poliinsaturados en Alga <i>Sargassum</i> Morales-Velázquez, AJ; Monroy-Barreto, M; Rodríguez-Salazar, MTJ	53

El presente documento se puede consultar en línea (acceso abierto) a través del sitio AMyD de la Facultad de Química, UNAM:

<https://amyd.quimica.unam.mx/course/view.php?id=662§ion=7>

Nota: Se recomienda realizar el tratamiento de la muestra correspondiente, en sesión experimental previa.

PRÁCTICA No. 1

DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES EN ALGA WAKAME

I. Introducción.

I.1 Fundamento de la Práctica.

El alga wakame (*Undaria Pinnatifida*) es una macroalga del filo *Phaeophyta*, pertenece al grupo de las algas pardas (Martínez-Hernández et al., 2017), la presencia de esta alga se descubrió en la Isla de Todos los Santos, Baja California, en 2003. Su valor económico es alto por el consumo de la macroalga en países asiáticos y se considera un alga invasora (Zertuche et al., 2006).

El wakame contiene del 25-30% de carbohidratos, del 5-18% de proteínas y del 1.4-3.1% de lípidos (Casas et al., 2010), estos valores son similares a los del sargazo, en el género *sargassum* se puede encontrar carbohidratos en un porcentaje del 25-60%, proteínas en un 3-17% y lípidos en un 0.01-4.3% (Amador-Castro et al., 2021).

La similitud entre el sargazo y la *undaria pinnatifida* en su contenido de macronutrientes como se muestra en la tabla 1 considerando distintas especies del género *sargassum*, se puede deber a que ambas pertenecen al filo de las algas pardas (Ávila Mosqueda; 2017; Martínez Hernández et al., 2017).

Las algas de la especie *undaria pinnatifida* presentan un alto contenido de minerales, para poder calcular este porcentaje se analiza la cantidad de cenizas totales presentes (Palasí Mascarós, 2015).

Especie	% de Cenizas Totales
<i>Sargassum cristaeifolium</i>	24.80 ± 0.08
<i>Sargassum horneri</i>	26.69
<i>Sargassum glaucescens</i>	36.93 ± 0.14
<i>Undaria Pinnatifida</i>	34

Tabla 1. Composición de cenizas totales en distintas especies de sargazo (Huang et al., 2016) y de alga wakame (Palasí Mascarós, 2015).



Figura 1. Balanza analítica.

I.2 Fundamentos de la Técnica Analítica.

El método gravimétrico es un método cuantitativo, basado en la medición de las masas del analito con una balanza analítica, (Skoog et al., 2015). Existen dos categorías de métodos gravimétricos; el método de volatilización y el método de precipitación (Baeza Reyes, 2016).

El método de volatilización determina el peso del producto a partir de la pérdida de peso de la muestra o por la recolección del gas que se desprende. Este método se aplica principalmente para la determinación de agua en muestras sólidas y de carbono en compuestos orgánicos (Baeza Reyes, 2016).

El método de precipitación convierte al analito en un precipitado poco soluble, este analito es filtrado para darle un tratamiento de calor y pesar (Skoog et al., 2015). Este método requiere que el precipitado sea fácil de filtrar y limpiar y sea poco soluble para evitar la pérdida de analito durante la filtración y el lavado, la muestra secada o calcinada deberá no reaccionar con componentes de la atmósfera y tener una composición química sea conocida después de ser secada o calcinada (Skoog et al., 2015).

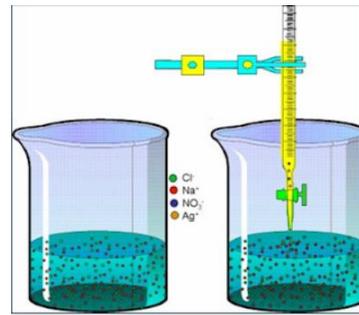


Figura 2. Representación de precipitado para gravimetría.

I.3 Aplicación de la técnica de acuerdo con el método 920.153 de la AOAC (1997).

El método gravimétrico es la técnica analítica que se utiliza para determinar la cantidad de cenizas presentes en una muestra, en este caso el wakame (Palasí Mascarós, 2015; AOAC, 1997), este tipo de método se basa en las medidas de masa realizadas en una balanza analítica (Skoog et al., 2005).

La determinación de las cenizas totales consta del pesado de 3 masas; la masa del crisol con tapa, la masa de la muestra en el crisol antes de introducirse a la mufla y la masa de las cenizas en el crisol, al final con estos tres datos se realiza un calculo para la obtención del porcentaje de cenizas totales dispuestas en la muestra (AOAC, 1997).

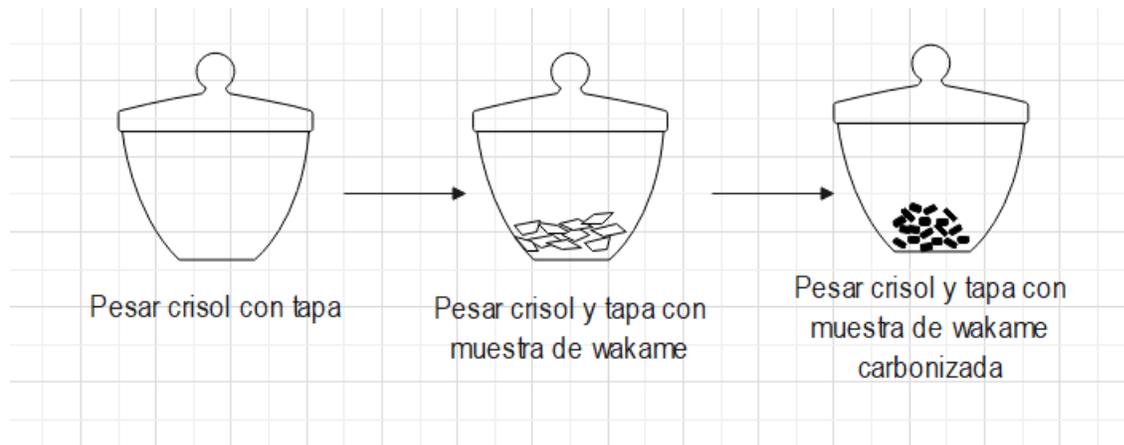


Figura 3. Diagrama de las masas a pesar para determinación de cenizas totales en alga wakame.

II. Objetivos.

II.1. Objetivo general.

- Comprender y aplicar el método gravimétrico en una biomasa comestible evaluando el contenido de minerales presentes en este alimento comercial.

II.2. Objetivos específicos.

- Determinar cuantitativamente las cenizas totales presentes en una muestra de alga wakame de una marca comercial.
- Utilizar el método gravimétrico por volatilización para la determinación de cenizas en alga wakame de una marca comercial.

III. Actividades Preliminares.

- Utilizando la investigación bibliográfica investigar las características físicas y químicas del wakame.
- Investigar cenizas totales presentes en alga wakame.
- Investigar si existe alguna norma en México que regule la cantidad de minerales presentes en estos alimentos.
- Investigar a que temperatura se debe calcinar un alimento deshidratado (por ejemplo, el té).
- Investigar la utilidad del certificado de calibración de las balanzas analíticas del laboratorio. (Leer el certificado analítico de la balanza proporcionado por el laboratorista/profesor)
- Investigar el correcto uso de la balanza analítica. (Consultar de la bibliografía Laboratorio de Ingeniería US, 2014 y Quimitube Laboratorio USS, 2018 e instructivo de la balanza proporcionado por el laboratorista/profesor)

IV. Procedimiento Experimental (AOAC, 2997; Palasí Mascarós, 2015)

Material, Equipo e Instrumentos.

- Balanza analítica
- Crisol con tapa
- Desecador
- Mufla
- Pinzas
- Placa calefactora

Reactivos

- 1.5 g de Wakame

Procedimiento

Se calienta a 500 ° C por 2 horas el crisol con su tapa, pasado el tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente en el desecador y se pesa. Se pesan 1.5 g de la lámina de wakame en el crisol con tapa y posteriormente se coloca el crisol con la muestra en la placa calefactora hasta que el wakame esté carbonizado.

La muestra carbonizada se introduce en la mufla a 550 °C por 5 horas hasta obtener cenizas blancas, las cenizas blancas se introducen al desecador con el crisol para enfriar a temperatura ambiente y finalmente pesar en balanza analítica.

Lista de Actividades	Marcar de realizada (X)
Leer práctica	
Realizar Actividades Preliminares	

Discutir en clase acerca de la práctica y las actividades preliminares	
Realizar Práctica	
Realizar análisis y tratamiento de datos	
Discutir resultados	
Contestar cuestionario	
Elaborar reporte	

Tabla 2. Listado de actividades de la práctica.

Apoyarse de la tabla 2 para el seguimiento de actividades a realizar durante la práctica.

Tratamiento de datos

Una vez obtenidas las masas del crisol con tapa, la muestra antes de meterla en la mufla y las cenizas con el crisol, se calcula el porcentaje de cenizas totales con la siguiente ecuación:

$$\frac{g_{cenizas}}{100 \text{ g de muestra}} = \frac{m3-m1}{m2} \times 100 \quad \text{Ecuación 1. (Palasí Mascarós, 2015)}$$

m1= masa en g del crisol en con la tapa

m2= masa en g de la muestra antes de meterla en la mufla

m3= masa en g de las cenizas con el crisol

V. Cuestionario.

1. ¿Qué tipo de método gravimétrico se realizó? Justifica tu respuesta.
2. ¿Por qué se incinera la muestra a 550 °C?
3. ¿Existe alguna normativa en México que indique la cantidad de cenizas que deben estar presentes en este tipo de alimentos? De ser así ¿Cumple la muestra la normativa?
4. En las cenizas se suelen encontrar minerales como calcio, fósforo y magnesio. ¿Qué instrumento analítico utilizarías para determinar la presencia de estos minerales?
5. ¿Qué factores influyen en el error de medición en este tipo de método gravimétrico?
6. De forma opcional realizar un video tutorial acerca del correcto manejo de la balanza analítica.

VI. Bibliografía

Amador-Castro F.; García-Cayuela T.; Alper, H.S.; Rodríguez-Martínez V.; Carrillo-Nieves D. (2021). Valorization of pelagic sargassum biomass into sustainable applications: Current trends and challenges. *Journal of Environmental Management* 283, 112013

Ávila Mosqueda S.V. (2017). *No todo lo que llega a la playa es sargazo: Caracterización y potencial aprovechamiento de los arribazones de macroalgas en Sisal, Yucatán*. Tesis para obtener el grado de licenciado, Universidad Nacional Autónoma de México.

AOAC. (1997) Determinación de Cenizas totales. Official Methods of Analysis. 15 ed. USA. Método 920.153.

Baeza Reyes J.J. (2017) Tema 4: Introducción al Análisis Gravimétrico. Química Analítica 1. Recuperado el día 14 de septiembre de 2021: <https://www.uv.es/~baeza/qai.html>

Casas, G.; Gil, M.; M, COMMENDATORE; Torres, A. (2010). *Evaluación de la composición químico-nutricional y del nivel de metales pesados e hidrocarburos en Undaria pinnatifida de los golfos San José y Nuevo, Chubut. Informe Final.* Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación, Prov. del Chubut. CENPAT-CONICET.

Laboratorios de Ingeniería US (2014). Manejo básico balanza analítica Metler Toledo. Recuperación el día 16 de diciembre de 2021: <https://www.youtube.com/watch?v=IwTn54JsoIs>

Martínez-Hernández G.B.; Castillejo N.; Carrión-Monteagudo M.M.; Artés F.; Artés-Hernández F. (2017). Nutritional and bioactive compounds of commercialized algae powders used as food supplements. *Food Science and Technology International*, 24(2) 172–182.

Palasí Mascarós J.-T. (2015). *Caracterización físico-química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario.* Trabajo fin de grado en ciencia y tecnología de los alimentos. Universitat Politècnica de Valencia.

Quimitube Laboratorio USS (2018) Uso correcto de una balanza analítica. Recuperado el día 16 de diciembre de 2021: <https://www.youtube.com/watch?v=7Q3tl7Qm4w4>

Villacrés Villacrés G.E. (2017). *Evaluación de la actividad insecticida del extracto acuoso de molle (Schinus molle L.) frente al gusano blanco de la papa (Premnotrypes vorax Hustache).* Documento final del proyecto de investigación como requisito para obtener el grado de ingeniería agrónoma. Universidad Técnica de Ambato.

Skoog D.A.; West D.M.; Holler F.J.; Crouch S.R. (2015) Fundamentos de química analítica. Springer 9, 280-283.

Zertuche González J.A.; Aguilar Rosas, L.E.; Aguilar Rosas R. (2006). Invasión del alga wakame en la isla de Todos Santos. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 32(202) 9-13.

PRÁCTICA No. 2

Determinación de cobre por voltamperometría hidrodinámica en algas comestibles comerciales del género *Sargassum*

I. Introducción

I.1 Fundamento de la técnica analítica

Se llama Voltamperometría a un conjunto de técnicas electroquímicas que detectan la variación de corriente (I) en función del potencial aplicado (E). Dichas técnicas procuran condiciones que favorecen la polarización del electrodo de trabajo, como el uso de electrodos con la menor superficie posible. (Skoog, West, Holler, Crouch, 2005) (Harris)

Con la información obtenida se realiza un gráfico de I vs E , llamado Voltamperograma, y del que es posible deducir información del analito (especie, estado de oxidación, potencial redox, concentración).

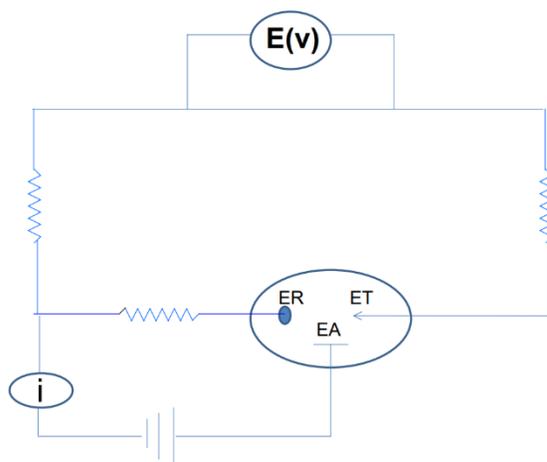


Figura 1. Diseño de la instrumentación para Voltamperometría.

E(V): potencióstato para controlar el barrido de potencial.

ET: electrodo de trabajo, donde ocurren y son medidos los procesos redox.

ER: electrodo de referencia, de potencial y composición conocidos y constantes.

EA: electrodo auxiliar, completa el circuito eléctrico conduciendo la electricidad desde la fuente de la señal hasta el ET. (Rojas-Escudero)

uando la información ha sido recolectada y graficada, el voltamperograma se ve de la siguiente manera

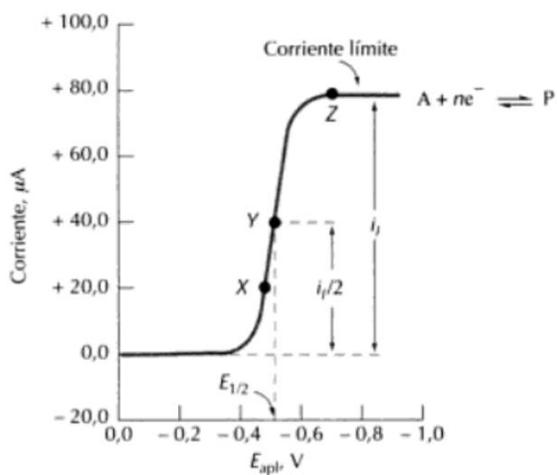


Figura 2. Voltamperograma de barrido lineal de la reducción de una especie A que se transforma en P.

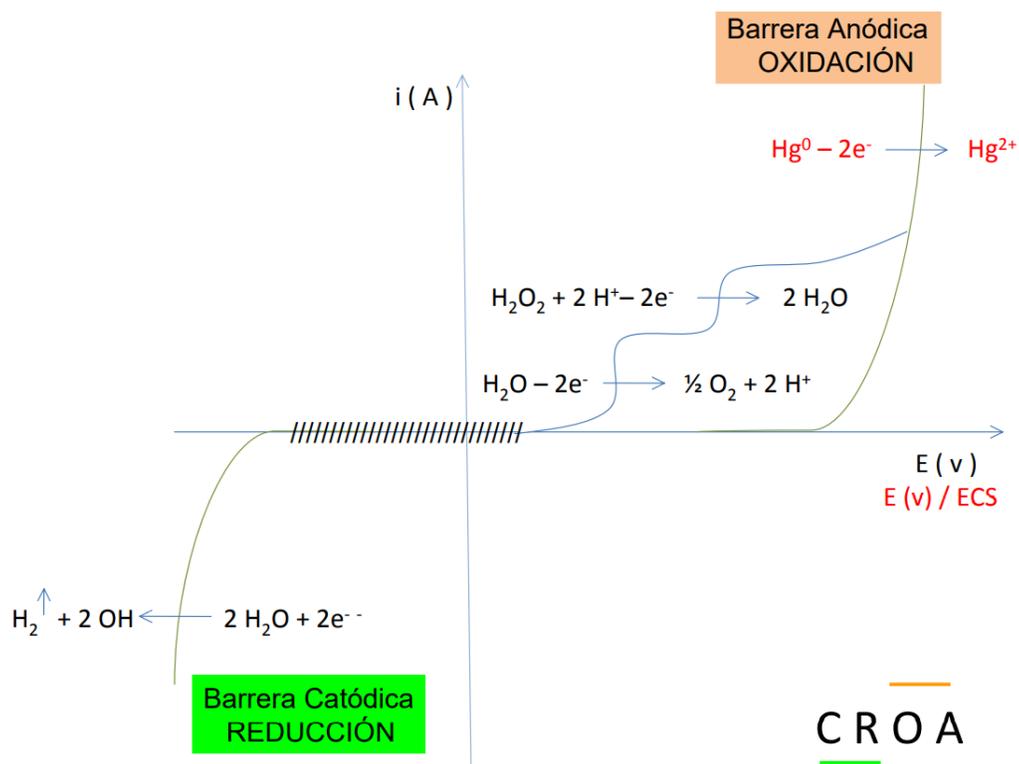


Figura 3. Ejemplo de voltamperograma.

- Electrolito soporte. Sal disuelta en el medio con el fin de abatir o minimizar los efectos de migración y la resistencia eléctrica. No debe modificar el potencial del par redox a monitorear.
- Barrera catódica -de reducción-. Potencial al cual se da la reducción del agua. Las especies con potenciales de reducción menores no podrán ser monitoreadas en este sistema.
- Barrera anódica -de oxidación-. Potencial al cual se da la oxidación del electrodo. Las especies con potenciales de oxidación mayores no podrán ser monitoreadas en este sistema.
- Dominio de electroactividad. El rango de potencial en el que se pueden obtener lecturas de corriente correspondientes a oxidaciones o reducciones de analitos.

La correcta elección de disolvente, de electrolito soporte y de electrodos debe considerar que el potencial redox del analito de interés esté dentro del dominio de electroactividad.

I.2 Aplicación de la técnica analítica

Los micronutrientes y oligonutrientes son las vitaminas y los minerales que se consumen en cantidades relativamente pequeñas (comparadas con los grandes grupos alimenticios), pero que son imprescindibles para las funciones orgánicas.

Algunas de las funciones del cuerpo humano en las que participa el cobre son formación de tejido conectivo, participación en el metabolismo del hierro, formación de mielina, formación de melanina, participación en la producción de tiroxina.

Por muy poco cobre que el organismo requiera, debe ser consumido regularmente, pues no se acumula. La Organización Mundial de la Salud recomienda, para un adulto, consumir entre 1 y 1.4 mg de cobre diariamente. Algunos de los alimentos con aporte importante de cobre se obtienen del mar, como las algas, los mariscos y el hígado de pescado. (National Institutes of Health, 2019)

Las algas comestibles comerciales del género *Sargassum* son Hijiki o hiziki (*Sargassum fusiforme*), Hondawara (*Sargassum enerve*) y Limu Kala (*Sargassum echinocarpum*).

II. Objetivos

- Comprender los conceptos electroquímicos empleados en voltamperometría.
- Desarrollar la capacidad de diseñar un sistema electroquímico en función de las características del analito de interés.
- Cuantificar el cobre presente en algas comestibles comerciales.
- Comparar la cantidad de cobre presente en diversas marcas y en diversas especies.

III. Actividad preliminar

Investigar

- $E^0 \text{Cu}^{2+}/\text{Cu}$ _____
- $E^0 \text{H}^+/\text{H}_2$ _____
- $E^0 \text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ _____
- $E^0 \text{Ag}^+/\text{Ag}$ _____
- $E^0 \text{Hg}^{2+}/\text{Hg}$ _____
- Toxicidad de reactivos
- ¿Cómo se obtiene una concentración por el método de adiciones patrón?
- ¿Qué ocurre al calentar abruptamente mezcla sulfonítrica?

IV. Procedimiento experimental

IV.1 Materiales y reactivos

Vaso de precipitados 150 mL

Algas comestibles comerciales Hijiki o hiziki (Sargassum fusiforme), Hondawara (Sargassum enerve) y Limu Kala (Sargassum echinocarpum)

Agua desionizada

Vaso de precipitados de 150 mL

Balanza analítica

Probeta 50 mL

Ácido nítrico HNO_3 concentrado

Ácido sulfúrico H_2SO_4 concentrado

Ácido nítrico HNO_3 1M (electrolito soporte)

Parrilla de calentamiento con agitación magnética

Barra de agitación magnética

Contenedor plástico de 1.5 L

Hielo

Papel filtro

Embudo Buchner

Matraz Kitasato

Manguera para vacío

Soporte universal

Pinza de tres dedos con nuez

Potenciostato

Fuente de poder

Multímetro

Electrodo de referencia de Ag/AgCl

Electrodo auxiliar de alambre de platino

Micropipeta

Pipeta volumétrica de 2.0 mL

Celda para voltamperometría

Acetato de sodio trihidratado 1M

Hidróxido de sodio RA

Nitrato de bismuto (III) $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 100 ppm

Minas (puntillas) 2H 0.7 mm

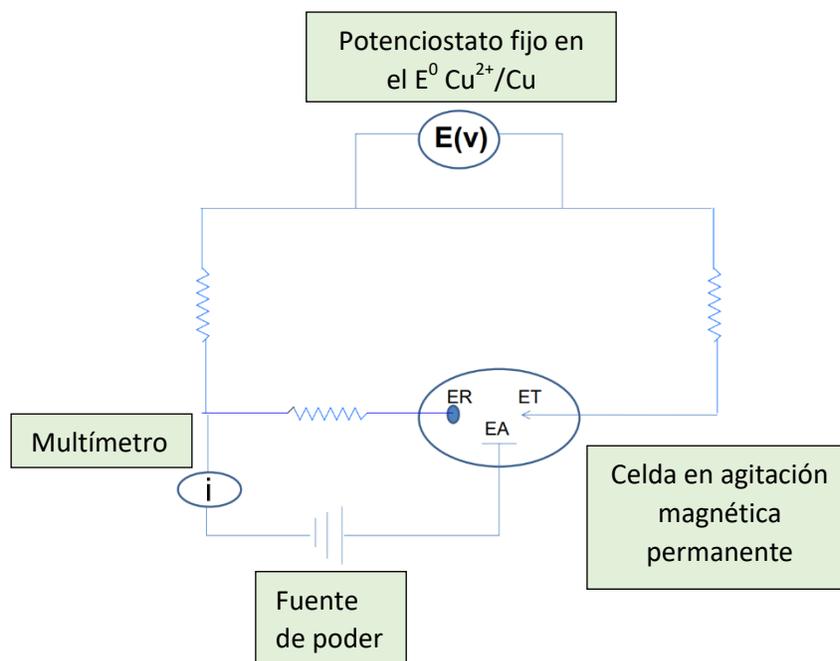
IV.2 Preparación de la muestra (García H., 2006)

- IV.2.1 EN CAMPANA Y SOBRE BAÑO DE HIELO. En vaso de precipitados de 10 mL, mezclar 6 mL de HNO_3 concentrado y 2 mL de H_2SO_4 . Esta será la disolución ácida digestora.
- IV.2.2 En vaso de precipitados de 150 mL agregar 10 g de alga + 50 mL de agua desionizada + 3 mL de disolución ácida digestora. Llevar a ebullición lentamente sobre parrilla de calentamiento y con agitación magnética. Disminuir volumen sin llegar a sequedad.
- IV.2.3 Agregar 2 mL más de disolución ácida digestora y continuar con el calentamiento. Se pretende obtener una disolución transparente. Detener el calentamiento cuando no haya disminución visible de cantidad de sólidos.
- IV.2.4 Filtrar al vacío. Impregnar el papel filtro con HNO_3 diluido. **Conservar el líquido.**

IV.3 Preparación de disoluciones (Rojas-Escudero)

- Disolución patrón (dP) de Cu^{II} 100 ppm: 12.9 mg de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o 39.3 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100.0 mL, aforar con agua desionizada.
- Punto 0: 10 mL de HNO_3 1M en la celda donde se efectuarán las mediciones.

IV.4 Verificación instrumental



IV.5 Preparación del electrodo de trabajo (Goldcamp M.J., 2008)

- En la celda para voltamperometría: 2.5 mL de acetato de sodio 1M + 1.0 mL líquido muestra + 0.100 mL dis Bi 100 ppm + 1 mL hidróxido de sodio 3.0M.
- Verificar $4.0 \leq \text{pH} \leq 4.5$. De ser necesario, ajustar con gotas de ácido nítrico concentrado.
- Sumergir 1 cm la punta de grafito en la solución
- Parámetros para ASV
conditioning step, $E = +0.500 \text{ V}$, $t = 20 \text{ s}$
deposition step, $E = -1.000 \text{ V}$, $t = 120 \text{ s}$
equilibration step, $E = -1.000 \text{ V}$, $t = 10 \text{ s}$
stripping step, $E_{\text{final}} = +0.500 \text{ V}$,
Estep = 0.005 V , pulse amplitude = 0.025 V , $\nu = 20 \text{ Hz}$.

IV.6 Adiciones

Punto	Adición de dP (μL)	Total de dP (μL)	Concentración (ppm)	Corriente, I (μA)
0	0	0	0	
1	10	10	0.1	
2	30	40		
3	30	70		
4	30	100		
5	30	130		

V. Cuestionario

- ¿Cuál fue la concentración de Cu determinada en cada muestra?
- ¿Qué ventajas consideras que tiene la voltamperometría sobre otras técnicas de análisis químico cuantitativo?
- ¿Qué desventajas consideras que tiene la voltamperometría ante otras técnicas de análisis químico cuantitativo?
- ¿Hay manera de conocer la concentración de Cu en la muestra sin efectuar curva de calibración? Justifica tu respuesta.
- ¿Efectuarías cambios en el método si la concentración de Cu calculada estuviera fuera de los límites de la curva de calibración? Si sí, ¿cuáles y por qué?
- En una dieta abundante de los productos analizados, ¿es posible cubrir la ingesta diaria recomendada de Cu?

VI. Referencias

- García H., E.-Z. M. (2006). Análisis comparativo de dos técnicas de digestión para la determinación de metales pesados en lodos residuales. *Multiciencias*, 3(6), 234-243. doi:1317-2255
- Goldcamp M.J., U. M. (Julio de 2008). An environmentally friendly, cost-effective determination of lead in environmental samples using Anodic Stripping Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 85(7), 976-979.
- Harris, D. C. (s.f.). *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverté.
- National Institutes of Health. (Diciembre de 2019). Obtenido de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-DatosEnEspañol/>
- Rojas-Escudero, E. (s.f.). *Administración de Manuales y Documentos*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MEQ_voltamperometria_36155.pdf
- Skoog, West, Holler, Crouch. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. Thomson.

PRÁCTICA No. 3

Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-Vis

I. Introducción.

I.I. Fundamento de la técnica analítica.

La espectrofotometría es una técnica que aprovecha la propiedad de las sustancias de absorber o emitir radiación electromagnética con una longitud de onda determinada para poder identificar de qué sustancia se trata o para medir la concentración de un soluto en una disolución, de ahí que se pueda realizar espectrofotometría de emisión o espectrofotometría de absorción. En la primera, se incide una luz a través de una disolución y posteriormente se mide la cantidad de luz absorbida por ésta, mientras que en la espectrofotometría de emisión se excita una muestra con luz y posteriormente se mide la energía emitida por los electrones de valencia de la muestra al volver al estado basal.

Los espectros de absorción y de emisión se miden mediante un instrumento denominado espectrómetro, utilizando longitudes de onda de la región UV-Visible.

La Figura 1 muestra un esquema de un espectrofotómetro convencional de haz simple. La luz policromática de la fuente se enfoca sobre la rendija de entrada de un monocromador, que transmite selectivamente una estrecha banda de luz. Esta luz, entonces, atraviesa el área de muestra hasta el detector. La absorbancia de la muestra se determina midiendo la intensidad de luz que alcanza el detector cuando no hay muestra (el blanco) y comparándola con la intensidad de la luz que alcanza el detector después de atravesar la muestra. Como se indica anteriormente, la mayoría de los espectrofotómetros contienen dos lámparas, de deuterio y de wolframio y utilizan tubos fotomultiplicadores o, más recientemente, fotodiodos, como detectores.

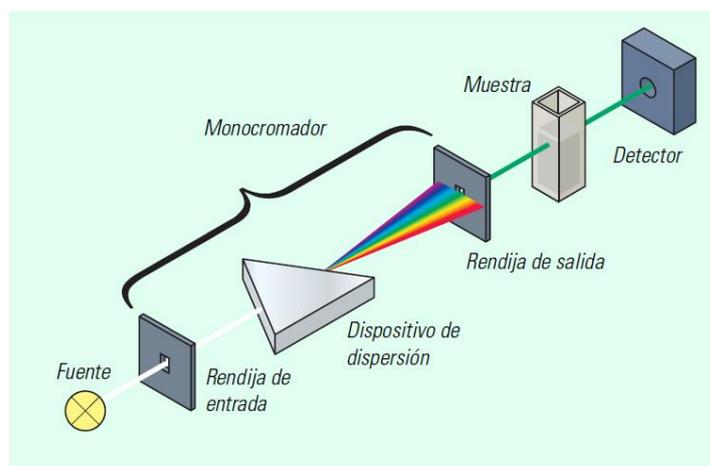


Figura 1. Esquema de un espectrofotómetro convencional (Owen, 2000)

La lectura que emite un espectrofotómetro es la absorbancia (A) que corresponde con la cantidad de luz absorbida con la muestra y se define como $A = \log \log \left(\frac{1}{T} \right)$, donde T es la transmitancia, es decir, la relación entre la cantidad de luz que llega al detector tras haber atravesado la muestra y la cantidad de luz incidente.

Se define como: $T = \frac{I_{trans}}{I_0}$ donde I_0 es la intensidad incidente e I_{trans} es la intensidad transmitida.

Partiendo de que $A = \log \log \left(\frac{1}{T} \right)$, se puede reescribir como

$$A = \log \log (1) - \log \log (T) = -\log \log (T) = -\log \left(\frac{I_{trans}}{I_0} \right) = \log \left(\frac{I_0}{I_{trans}} \right)$$

La Ley de Lambert-Beer explica la relación entre la absorbancia y la concentración de la muestra, así como de la distancia que recorre el haz de luz a través de la muestra, es decir, el ancho de la celda (l).

Mientras mayor sea la concentración mayor será la absorbancia, algo similar sucede con la distancia recorrida por la radiación, ya que mientras mayor sea la distancia, mayor será la absorbancia. Por último se añade una constante de proporcionalidad conocida como el coeficiente de absortividad(c) que denota energía radiante absorbida por unidad de concentración por unidad de longitud y tiene unidades de $\frac{L}{mol \cdot cm}$, este coeficiente depende directamente de la naturaleza del soluto, la naturaleza del disolvente, la temperatura y la longitud de onda.

$$A = \log \log \left(\frac{I_0}{I_{trans}} \right) = \epsilon lc$$

Figura 2. Ley de Lambert- Beer (Owen, 2000)

La ley de Lambert-Beer sólo es válida para disoluciones muy diluidas, ya que sólo es de interés conocer la luz absorbida por el soluto, por lo cual, concentraciones elevadas del soluto propiciarían interacciones soluto-soluto y soluto-disolvente que modificarían los resultados obtenidos.

I.II. Aplicación de la técnica analítica.

Los procesos metabólicos de la mitocondria generan especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), las cuales están involucradas en la señalización celular y homeostasis (Turrens, 2013). Además, las ROS también pueden originarse de manera exógenas debido a factores ambientales tales como la radiación ultravioleta, contaminantes, pesticidas, humo del tabaco, entre otras (Paredes et al. 2002). Se ha demostrado que a altas concentraciones las ROS inducen la oxidación, dañando proteínas, lípidos y carbohidratos (Valko et al. 2007).

De manera natural, el cuerpo humano, cuenta con múltiples enzimas antioxidantes para contrarrestar los efectos negativos de las especies reactivas del oxígeno, entre las cuales se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa. Con el fin de complementar los efectos de dichas enzimas, se ha explorado la adición de antioxidantes sintéticos a los alimentos, suplementos cosméticos y productos farmacéuticos (Kang et al. 2019). Sin embargo, se sospecha que los antioxidantes sintéticos son tóxicos para el cuerpo cuando se utilizan a largo plazo (Fangfang et al. 2019); asociados a daño

hepático y carcinogénesis, de manera que la identificación de antioxidantes derivados de sustancias naturales como alternativa a los antioxidantes sintéticos es de gran interés académico e industrial. (Alenisan, et al. 2017). Una fuente de estos compuestos son las algas marinas, las cuales poseen gran cantidad de materiales bioactivos tales como los polifenoles, polisacáridos, entre otros.

El Sargazo es un alga marina, perteneciente al género *Sargassum* de la familia Sargassaceae, orden Fucales, subclase Cyclosporeae, clase Phaeophyceae y generalmente reconocida como alga de golfo. El género *Sargassum* contiene aproximadamente 400 especies distribuidas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Johnson et al, 2019). Estas algas pardas contienen múltiples compuestos bioactivos y muestran diversas actividades biológicas, entre las que se encuentran antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticancerígeno, anti-envejecimiento, antilipídico, estabilizante de membrana, protector contra enzimas metabólicas, control del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Palanisamy et al. 2018 y Kang et al. 2019).

Análisis fitoquímicos muestran que estas algas pardas contienen múltiples compuestos bioactivos incluyendo polifenoles y polisacáridos, los cuales son capaces de prevenir o retardar la oxidación al interactuar con los radicales libres y reducirlos, otorgándole a estas algas pardas propiedades antioxidantes. (Kang et al. 2019).

Los compuestos fenólicos y flavonoides han sido ampliamente reconocidos en las algas marinas, confirmando su potente rol en la quelación de iones metálicos, evitando la formación de radicales libres y mejorando el sistema antioxidante interno en condiciones ambientales de estrés. (Gehan, A.I., 2017)

II. Objetivos

- Introducir al alumno en la aplicación de la técnica analítica: Espectrofotometría UV-Visible
- Estimular el aprendizaje a través de la investigación bibliográfica, observación y registro experimental
- Comprender los conceptos relacionados
- Aplicar los conocimientos teórico-prácticos previamente adquiridos relacionados con el tema de la práctica.

III. Actividad preliminar

1. Elaborar un mapa conceptual que indique, represente y relacione el significado de los diversos conceptos esenciales del tema de la práctica
2. Defina cómo se selecciona la longitud de onda específica para una muestra.
3. ¿Qué es un cromóforo?
4. ¿Qué es una curva de calibración?
5. ¿Qué es un blanco de calibración, de muestra y de reactivos?
6. ¿Qué es verificación instrumental?
7. Realizar los cálculos pertinentes para preparar las soluciones.
8. Consulte las horas de seguridad de los reactivos a utilizar.

IV. Procedimiento Experimental

Siga las indicaciones del Profesor de la Asignatura para la operación básica del equipo e instrumentación analítica a utilizar

El procedimiento experimental se llevará a cabo conforme a lo establecido por Arsianti et al, 2020

Material, Equipo e Instrumentos:

- Espectofotómetro UV-Visible
- Celdas para espectofotómetro
- Homogeneizador de vidrio
- Mortero de porcelana con pistilo
- Equipo de filtración al vacío
- Rotaevaporador
- Micropipeta de 600 μL
- Micropipeta de 30 μL
- Balanza analítica
- Vaso de precipitado de 25 mL
- Tubos de ensayo
- Vortex
- Pizeta con agua destilada
- Matraz aforado de 10mL

Reactivos

- Etanol al 75%
- AlCl_3 al 20%
- CH_3COOK 2M
- Quercetina (1000 $\mu\text{g/mL}$)

Preparación de la muestra.

1. Lavar la muestras obtenidas con agua destilada para eliminar impurezas
2. Dejar secar la muestra a temperatura ambiente durante una semana.
3. Una vez seca el alga, utilizar un mortero para pulverizar la muestra.

Preparación del extracto

1. En un recipiente de vidrio, macerar 250g del polvo de sargazo con etanol durante 7 días, agitando ocasionalmente. Repetir este paso tres veces para concentrar la mayor cantidad posible.
2. Filtrar la maceración
3. Utilizar un rotaevaporador para concentrar los productos obtenidos

Cuantificación de flavonoides

1. Disolver 10mg del extracto de Sargazo en 10 mL de etanol (S1)
2. En un tubo de ensayo, colocar 600 μL de la disolución anterior, 30 μL de AlCl_3 al 20% y 30 μL de CH_3COOK 2M. Añadir agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.5mL.
3. Homogeneizar la mezcla con ayuda de un vortex
4. Incubar en oscuridad durante 30 min
5. Para el blanco, deben seguirse los pasos anteriores (2-7) de la misma manera pero sin agregar el extracto de Sargazo a la mezcla.

Preparación de la curva patrón

Prepara las 6 soluciones estándar de concentración conocida de flavonoides para la curva de calibración: 0, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Utilice la solución que quercitina (1000 $\mu\text{g/mL}$) y etanol al 75%.

Registre la información en su bitácora de prácticas.

Nota: Prepare el blanco de calibración correspondiente.

Verificación instrumental

Solicitar al profesor de asignatura el procedimiento para la verificación del instrumento: espectrofotómetro UV-Visible (uv spectrophotometer, uv 1500pc).

Análisis

1. Encender el equipo.
2. Elegir la longitud de onda deseada con el selector. (440 nm)
3. Ajustar con el blanco el 0% de absorbancia trabajando con la tapa cerrada.
4. Coloque cada una de las soluciones de la curva de calibración (de menor a mayor concentración) en el espectrofotómetro y registre la absorbancia.
5. Coloque la muestra en el espectrofotómetro y registre la absorbancia
6. Apague el equipo
7. Registre en una tabla los valores obtenidos para cada solución.

Grafique la curva de calibración Absorbancia vs Concentración de cada solución estándar, para obtener la concentración de la solución de muestra medida y multiplique por el factor de dilución correspondiente.

Evalue la información obtenida.

Observe y registre la información en su bitácora de prácticas.

Nota: Realice las mediciones de cada solución por triplicado, y registre el valor de absorbancia en su bitácora

V. Cuestionario

1. ¿Podría realizarse la extracción de flavonoides con otro disolvente orgánico? ¿Cuál recomienda utilizar?
2. ¿Por qué deben dejarse las muestras 30 min en la oscuridad?
3. Determine la cantidad de flavonoides presentes en la muestra.

VI. Bibliografía

- Alenisan, M. A., et all, 2017, Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives:A review, Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences, 24, 101-106.
- Fangfang, Y.,et all, 2019, Characterization, Antioxidant, Anti-Aging and Organ Protective Effects of Sulfated Polysaccharides form Flammulina velutipes, Molecules, 24, 3571.
- Johnson, M., et all 2019, The antioxidative effects of bioactive products from Sargassum polycystum C. Agardh and Sargassum duplicatum J. Agardh against inflammation and other pathological issues, Complementary Therapies in Medicine, 46, 19-23,
- Kammeyer, A., Luiten, R.M., 2015. Oxidative events and skin aging. Ageing Research Reviews. 21, 16-29.
- Kang, M.,et all., 2019, Antioxidant properties of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of Sargassum thunbergii, International Journal of biological Macromolecules, 132, 142-149.
- Lephart, E.D., 2016, Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms, Ageing Research Reviews. 31, 36-54.
- Palanisamy, S., et all, 2018, International Journal of Biological Macromolecules 116, 151-161.

- Paredes, F., Roca, J.J., 2002, Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular, OFFARM, 21 (7), 96-100.
- Turrens, J.F., 2003, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, the Journal of Physiology, 552, 335-344.
- Valko, M., et al, 2007, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44-84
- Arsianti, A., Bahtiar, A., Wangsaputra, V.K., Azizah, N.N., Fachri, W., Nadapdap, L.D., Fajrin, A.M., Tanimoto, H., Kakiuchi, K., 2020, Chemical Composition and Evaluation of Marine Algal *Sargassum polycystum* for Antioxidant Activity and In Vitro Cytotoxicity on Hela Cells, Pharmacogn, 12(1), 88-94.
- Díaz, A. et al s.f. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Martes 24 de enero del 2021 de Universidad de Córdoba. Recuperado de: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
- Pérez, G. s.f. Espectrometría. Martes 24 de enero del 2021 de Espectrometria.com. Recuperado de: <https://www.espectrometria.com/>

PRÁCTICA No. 4

Cuantificación de polifenoles totales en tejido de alga marina *Sargassum spp.* mediante Espectrofotometría UV-Visible

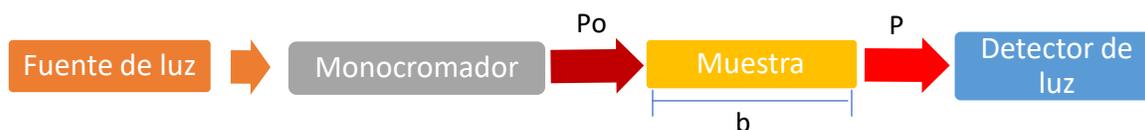
I. Introducción.

I.1. Fundamento de la técnica analítica.

La espectroscopia UV-Visible es una técnica analítica instrumental que se utiliza para la determinación cuantitativa de especies químicas orgánicas e inorgánicas. Con base en la medición de la radiación electromagnética absorbida por una sustancia al incidir a través de ella un haz de luz de cierta longitud de onda que se encuentra dentro del espectro UV-Visible. (Skoog et al, 2008)

Un espectrofotómetro funciona de la siguiente manera: la luz es generada por una lámpara de arco de deuterio y se hace pasar a través de un monocromador que ajusta la longitud de onda que se irradia (Potencia radiante, P_o) hacia la muestra contenida en una celda de cuarzo y finalmente la potencia emergente (P) es detectada y cuantificada en términos de Transmitancia y Absorbancia.

Figura 1. Principio de la medición espectroscópica. (Harris C, 2004)



Las moléculas presentes en la muestra pueden absorber cierta cantidad de luz tal que la Potencia emergente (P) siempre será menor o igual a la Potencia radiante (P_o). La Transmitancia (T) es por tanto la fracción de luz incidente que sale de la muestra.

Ecuación 1. Transmitancia.

$$T = \frac{P}{P_o}$$

La Absorbancia (A) se define como:

Ecuación 2. Absorbancia.

$$A = \log \frac{P_o}{P} = -\log T$$

La ley de Lambert-Beer establece que existe una relación directamente proporcional entre concentración (c) y Absorbancia (A). El término ϵ corresponde a la absorptividad molar.

Ecuación 3. Ley de Lambert-Beer

$$A = \epsilon bc$$

De manera práctica, el contenido de cierta sustancia en una muestra se puede determinar por medio de la regresión lineal de una curva de calibración elaborada con soluciones de concentración conocida de una especie química igual o similar al analito de interés. Para ello se requiere medir la absorbancia de cada una de las soluciones y posteriormente graficar los resultados de absorbancia vs concentración. De tal forma que en la ecuación de la recta con coeficiente de correlación ($R^2 > 0.98$), y corresponde al valor de absorbancia, x será igual a la concentración, mientras que m y b tomaran valores constantes.

Ecuación 4. Ecuación de la recta para la curva patrón.

$$y = mx + b$$

Ecuación 5. Ecuación de la curva patrón en términos de concentración y absorbancia.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} - b}{m}$$

En general los compuestos orgánicos analizados mediante espectroscopia UV-Vis contienen grupos funcionales no saturados que absorben radiación visible, es decir, son coloridos. Sin embargo cuando el analito de interés carece de color o simplemente por conveniencia del analista, se recurre a la formación de un complejo colorido a través de diversas reacciones químicas (Skoog et al, 2008). Por ejemplo: la formación de un complejo colorido cuando el cloro libre reacciona con la ortotoluidina o la reacción colorimétrica de los compuestos fenólicos con agentes oxidantes, que es precisamente la determinación que se realizará en esta práctica.

I.2. Aplicación de la técnica analítica.

La producción de energía celular implica la inevitable formación de radicales libres, es decir, átomos o moléculas con uno o más electrones no apareados en su último orbital molecular, que son capaces de oxidar biomoléculas como lípidos, proteínas y Ácido Desoxirribonucleico (ADN, que es el material genético hereditario de los seres humanos y de casi todos los organismos vivos).

Para contrarrestar el efecto dañino de los radicales libres los organismos aerobios (como los seres humanos) cuentan con un sistema antioxidante conformado por enzimas y sequestradores químicos. Cuando el equilibrio homeostático entre radicales libres y dicho sistema se desplaza hacia el exceso de radicales, se provoca el *Estrés oxidativo*, que ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes tipo 2 y el cáncer. (Méndez & Sánchez, 2013).

En vista de lo anterior se han estudiado la actividad antioxidante de diversos compuestos de origen natural, entre ellos sobresalen los compuestos fenólicos, que en su mayoría son metabolitos secundarios de plantas terrestres, ya que presentan altos valores de actividad antioxidante y de captura de radicales in vitro e in vivo. (Lim et al, 2018).

El contenido fenólico en las algas marinas del género *Sargasum* ha sido ampliamente detallado en la literatura, este grupo de compuestos se compone principalmente de flavonoides y polímeros de floroglucinol (Gorham & Lewey, 1984), también conocidos como florotaninos. Los florotaninos más abundantes en sargazo son: bieckol,

florofucofuroeckol A, dieckol, y eckol (Sharifian et al, 2019). Sin embargo la mayoría de la información cuantitativa disponible está expresada como *compuestos fenólicos totales* y su concentración varía de acuerdo con la especie analizada, la estación del año en que se realiza la recolección (Kumar et al, 2015), así como el solvente y la técnica de extracción utilizada.

Una de las técnicas más utilizadas para la determinación del contenido de fenoles es el método de Folin-Ciocalteu, que consiste en la reacción redox entre el analito y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Tungstato de sodio dihidratado y Molibdato de sodio dihidratado), cuyo producto es un compuesto azul que se lee a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales en diferentes especies de Sargazo.

Especie de Sargazo	Polifenoles totales (mg GAE / g)	Referencia
<i>Sargassum duplicatum</i>	8.4 a 149.52	Johnson et al, 2019
<i>Sargassum polycystum</i>	17.46 a 33.49	Johnson et al, 2019
<i>Sargassum vestitum</i>	10.84 a 74.05	Dang et al, 2017
<i>Sargassum muticum</i>	10 a 110	Balboa et al, 2015

Las unidades en que se expresa la concentración son: mg de ácido gálico equivalente (GAE por sus siglas en inglés) y se utilizan ya que la curva de calibración para la determinación de polifenoles totales está elaborada con este ácido como patrón.

Figura 1. Bioeckol

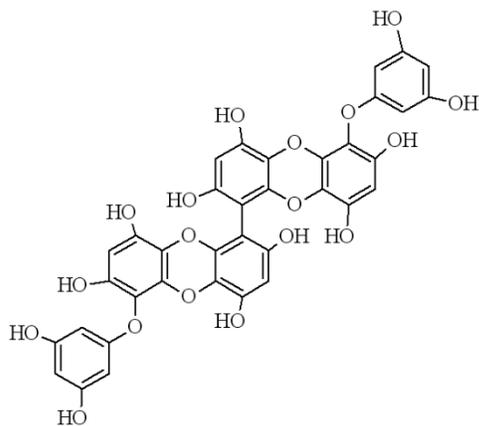
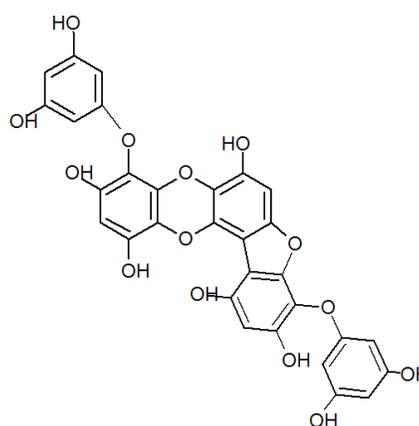


Figura 2. Florofucofuroeckol A



II. Objetivos

II.1. Objetivo general.

- Introducir al estudiante en la técnica analítica instrumental de espectrometría UV-Vis por medio de la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en una muestra real.

II.2. Objetivos específicos.

- Conocer la correcta operación de un espectrofotómetro y las precauciones que se deben tener durante su utilización.

- Comprender los conceptos relacionados con espectrometría UV-Vis.
- Cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos en una muestra algal real.

III. Actividades preliminares.

- Consulte las hojas de seguridad de cada uno de los reactivos a utilizar en la práctica.
- Investigue por qué se utiliza ácido gálico como patrón para la elaboración de la curva de calibración.
- Investigue el mecanismo de reacción de un antioxidante.
- Investigue los componentes principales de un espectrofotómetro UV-Vis y su función.

IV. Procedimiento experimental.

Material, equipos e instrumentos.

- Espectrofotómetro UV-Vis
- Celdas de cuarzo
- Equipo de ultrasonido
- Balanza analítica
- Vortex
- Micropipeta de 1000 microlitros
- Puntas de micropipeta
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Matraz aforado de 25 mL
- 15 tubos de ensayo
- Gradilla
- Pizeta con agua destilada
- Espátula
- Papel filtro
- Frasco ámbar de 100 mL

Reactivos.

- 10 g de Sargazo seco y molido
- Acetona al 70%
- Reactivo Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma-Aldrich)
- Solución de Na_2CO_3 al 20%
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich)

Nota: Todos los reactivos deben ser grado analítico.

Verificación instrumental.

Solicitar al profesor de la asignatura el procedimiento para realizar la verificación del instrumento espectrofotómetro UV-Vis (UV Spectrophotometer, UV 1500pc).

IV.1 Preparación de la muestra.

1. Secar el material algal en estufa a 50 °C durante 48 h
2. Una vez seco, moler la muestra lo más fino posible con un molino para maíz o con un mortero con pistilo.
3. Colocar el alga molida en un recipiente y almacenar en un desecador de vidrio hasta el momento de su utilización.

IV.2 Extracción de los compuestos fenólicos totales.

La extracción de los compuestos fenólicos totales se realizará de acuerdo con la metodología propuesta por Dang et. al, 2017. Para ello:

1. Pesar 10 g de alga seca y molida.
2. Colocar el alga en un vaso de precipitados de 250 mL y añadir 60 mL de acetona al 70%.
3. Sónicar durante 90 minutos a 30 °C con una potencia de 250 W.
4. Filtrar y colocar el sobrenadante en un frasco ámbar con tapa, etiquetar y almacenar en refrigeración hasta el momento de su utilización.

NOTA: Por motivos de tiempo se recomienda que se realice la preparación de muestra así como la extracción de los compuestos fenólicos en una sesión de laboratorio previa.

IV.3 Elaboración de la curva de calibración.

Para realizar la curva de calibración se utilizará ácido gálico como patrón, a las concentraciones 0, 6.25, 12.5, 50, 100 µg de Ácido Gálico / mL de acuerdo con la metodología reportada por Arsinati et. al, 2020.

Elaboración de la solución madre de ácido gálico.

1. Pesar 0.0100 g de ácido gálico en la balanza analítica.
2. Solubilizar con la mínima cantidad de agua destilada.
3. Llevar al aforo en un matraz aforado de 25 mL.

Elaboración de las diluciones de ácido gálico a partir de la solución madre.

1. Ajustar el volumen de la micropipeta y tomar los mL necesarios de solución madre para cada una de las concentraciones requeridas, de acuerdo con la tabla 2.
2. Colocar la alícuota en un tubo de ensayo y agregar los mL necesarios de agua destilada necesarios para lograr el volumen final de 10 mL.
3. Etiquetar cada tubo de ensayo con la concentración que le corresponde.

Nota: Recuerde cambiar de punta entre cada toma de alícuota.

Tabla 2. Guía para la elaboración de diluciones para la curva de calibración.

Concentración de ácido gálico (µg / mL)	mL necesarios de solución madre	mL necesarios de agua para lograr el aforo
100	2.5	7.5
50	1.25	8.75

12.5	0.31	9.69
6.25	0.15	9.85
0	0	10

Método Folin-Ciocalteu para la formación del complejo colorido de acuerdo con Dang et. al 2017.

Para cada una de las diluciones de diferente concentración:

1. Tomar 500 μL de la disolución y colocarlos en un tubo de ensayo.
2. Adicionar 2500 μL del reactivo Folin - Ciocalteu y agitar 3 minutos en el vortex.
3. Adicionar 2000 μL de Na_2CO_3 al 20% y homogeneizar en vortex.
4. Dejar reposar en completa oscuridad a temperatura ambiente por 1 h.

Determinación espectrofotométrica.

1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 765 nm.
2. Enjuagar con agua destilada la celda de cuarzo, procurando tomarla por el costado esmerilado. Secar el exceso de agua con un pañuelo desechable.
3. Tomar una alícuota de 3.5 mL y llenar la celda, procurar no rebasar la línea del aforo.
4. Colocar la celda en el espectrómetro y medir absorbancia. Realizar cada determinación por triplicado.
5. Graficar los datos de absorbancia vs concentración.
6. Obtener la ecuación de la recta para la curva de calibración.

Nota: El coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0.98, si no es así se debe repetir las determinaciones para aquellas diluciones cuya medición de absorbancia presente mayor desviación con respecto a la linealidad de la curva.

IV.4 Análisis de la muestra de sargazo.

Método Folin-Ciocalteu para la formación del complejo colorido de acuerdo con Dang et. al 2017.

1. Tomar 500 μL del extracto de compuestos fenólicos y colocarlos en un tubo de ensayo.
2. Adicionar 2500 μL del reactivo Folin - Ciocalteu y agitar 3 minutos en el vortex.
3. Adicionar 2000 μL de Na_2CO_3 al 20% y homogeneizar en vortex.
4. Dejar reposar en completa oscuridad a temperatura ambiente por 1 h.
5. Realizar un blanco de reactivos. Para ello tomar una alícuota de 500 μL de acetona al 70% y colocarlos en un tubo de ensayo. Posteriormente llevar a cabo las actividades de los incisos 2 al 4.

Determinación espectrofotométrica.

1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 765 nm.
2. Enjuagar con agua destilada la celda de cuarzo, procurando tomarla por el costado esmerilado. Secar el exceso de agua con un pañuelo desechable.

3. Tomar una alícuota de 3.5 mL y llenar la celda, procurar no rebasar la línea del aforo.
4. Colocar la celda en el espectrómetro y medir absorbancia. Realizar la determinación por triplicado.

Análisis de los resultados.

1. Sustituir los valores de absorbancia obtenidos en la ecuación de la curva de calibración para encontrar la concentración de polifenoles totales en el extracto.
2. Realizar los cálculos necesarios para expresar los resultados en (mg GAE / g alga seca).

V. Cuestionario

- 1) ¿Cuál es el rango de longitudes de onda correspondientes al espectro Ultravioleta – Visible?
- 2) ¿Qué tipo de relación guarda la Transmitancia y la Absorbancia con la concentración de la muestra y por qué?
- 3) ¿Bajo qué circunstancias podría fallar la Ley de Lambert-Beer?
- 4) ¿Cuál es la importancia de contar con una celda de referencia (o blanco de reactivos)?
- 5) ¿Por qué se utilizan celdas de cuarzo y no de algún otro material transparente?
- 6) ¿Por qué se realizó la lectura a 765 nm y no a otra longitud de onda?
- 7) Desarrolla un protocolo de manejo de los residuos de esta práctica.

VI. Bibliografía

Arsianti, A., Bahtiar, A., Wangsaputra, V., Azizah, N., Fachri, W., & Nadapdap, L. et al. (2020). Phytochemical Composition and Evaluation of Marine Algal *Sargassum polycystum* for Antioxidant Activity and In Vitro Cytotoxicity on Hela Cells. *Pharmacognosy Journal*, 12(1), 88-94.

Balboa, E. M., Gallego-Fábrega, C., Moure, A., & Domínguez, H. (2015). *Study of the seasonal variation on proximate composition of oven-dried Sargassum muticum biomass collected in Vigo Ria, Spain. Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1943–1953.

Dang, T. T., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2017). *Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga Sargassum vestitum. Separation Science and Technology*, 53(11), 1711–1723.

Dosal, M., & Villanueva, M. (2008). *Antología de Química Analítica Experimental. Curvas de calibración en los métodos analíticos* [Ebook]. Ciudad de México. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ANTOLOGIA_24903.pdf

Gorham, J. and Lewey, S. (1984). Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Marine Biology*, 80(1), pp.103-107.

Harris, D. (2004). *Análisis Químico Cuantitativo*. 2nd ed. Barcelona: Reverté, p.497-508

Johnson, M., Kanimozhi, S. A., Joy Jeba Malar, T. R., Shibila, T., Freitas, P. R., Tintino, S. R., Coutinho, H. D. M. (2019). *The antioxidative effects of bioactive products from Sargassum polycystum C. Agardh and Sargassum duplicatum J. Agardh against inflammation and other pathological issues*. *Complementary Therapies in Medicine*, 46, 19–23

Kumar, S., Sahoo, D., & Levine, I. (2015). *Assessment of nutritional value in a brown seaweed Sargassum wightii and their seasonal variations*. *Algal Research*, 9, 117–125.

Lim, S., Choi, A.-H., Kwon, M., Joung, E.-J., Shin, T., Gil Lee, S., Kim, H.-R. (2018). *Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from Sargassum serratifolium and its major antioxidant components*. *Food Chemistry*.

Méndez, N., & Sánchez, V. (2013). *Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad*. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161-168.

Sharifian, S., Shabanpour, B., Taheri, A. and Kordjazi, M., (2019). *Effect of phlorotannins on melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) during iced storage*. *Food Chemistry*, 298, p.124980.

Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158

Skoog, D., Holler, F. and Crouch, S., (2008). *Principios De Análisis Instrumental*. 6th ed. Mexico, México: Cengage Learning Editores S.A. de C.V., p.336-375

PRÁCTICA No. 5

Análisis de pigmentos algales en muestras de macroalgas (Sargassum).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fundamento de la técnica analítica

Los métodos espectroscópicos analíticos miden la cantidad de radiación que es absorbida o producida por especies moleculares/atómicas en estudio. De acuerdo con la radiación que emitan o absorban se van a ubicar en diferentes regiones del espectro electromagnético clasificándose de esta forma en: rayos g, rayos X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), microondas y las de radiofrecuencia (RF). Estos métodos analíticos son una herramienta útil para determinaciones cuantitativas y cualitativas tanto de compuestos inorgánicos como orgánicos. (Skoog et al. 2014)

Una transición desde un nivel bajo a un nivel alto de energía acompañado de una transferencia de energía se llama absorción. (Lab. Eq. Y Cin. 2010) Diferentes especies químicas moleculares orgánicas e inorgánicas absorben radiación ultravioleta (UV) y visible en función de longitudes de onda específicas (dentro de un rango de 0.6 a 380 nm) (Monge, P. S., 2015); esta cantidad de energía radiante absorbida se produce por la excitación de los electrones de enlace, por lo tanto, la longitud de onda de los máximos de absorción se puede relacionar con los enlaces de las especies absorbentes (Téllez et al. 2020).

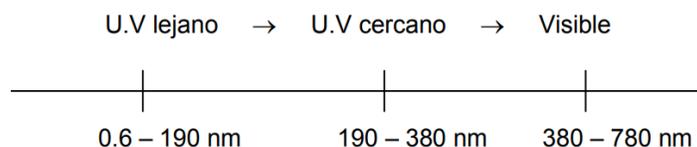


Figura 1. Rango de lectura para UV-Visible (Téllez et al. 2020)

Para llevar a cabo esta técnica se emplea un espectrofotómetro, instrumento en el cual se detecta la cantidad de luz producida o absorbida a través de la muestra en estudio (solución) depositada en una celda, comparándola con la que se produce o absorbe a través de una solución de referencia (blanco) (Téllez et al. 2020). Los espectrofotómetros ofrecen varias ventajas considerables, pueden variar continuamente la longitud de onda empleada, son simples, resistentes y de bajo costo (Skoog et al. 2014).

La transmitancia de la muestra se define como la relación de la radiación transmitida y la incidente ($T = \frac{I}{I_0}$). La disminución de la intensidad de la radiación depende de la concentración del absorbente y de la longitud del camino recorrido por el haz. Estas relaciones se recogen en la Ley de Lambert-Beer, la cual es el fundamento de la espectrofotometría.

$$A = -\log_{10} T = \epsilon b c$$

Establece una relación lineal entre la absorbancia (A) y la concentración (c), donde:

ϵ es la constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absorción molar, absortividad molar o coeficiente de extinción ($M^{-1} cm^{-1}$). Es la característica de una sustancia que nos dice cuánta luz absorbe a una longitud de onda determinada.

b es el paso óptico, anchura de la celda que contiene la muestra (cm).

c es la concentración molar de la especie (M) de la cual estamos midiendo la absorbancia.

La ley de Lambert-Beer se cumple para una radiación monocromática que atraviesa una disolución diluida ($\leq 0.01M$), cuando la especie absorbente no participa en un equilibrio que dependa de su concentración.

1.2 Aplicación de la técnica analítica

Las algas se han venido utilizando desde hace mucho tiempo como alimento y fertilizante; sin embargo, con el desarrollo industrial en los últimos años, cada día se emplean más para extraer compuestos químicos de gran valor económico (Murillo, G. M., 2017).

La clorofila es un pigmento verde presente en las algas cuya función es la absorción de la energía luminosa en diferentes longitudes de onda, y transferir esta a los centros de reacción donde es utilizada para realizar la fotosíntesis. Estos pigmentos están divididos en tres grupos: Clorofilas (a, b, c1, c2, c3), Carotenoides (carotenos y sus derivados oxigenados conocidos como xantofilas), y Bilioproteínas (aloficocianinas, ficocianinas, ficoeritrinas). En el reino vegetal, la clorofila a es el pigmento universal y la cantidad de clorofila a respecto a otros componentes celulares y o pigmentos presentes en el tejido va a variar de acuerdo con factores como limitación de luz y nutrientes, entre otros (Lobban & Harrison, 1994). Por sus características y beneficios a la salud se extrae y se utiliza en alimentos, farmacia y cosmética. Por su alta concentración se extrae generalmente de las espinacas, berro y acelgas, aunque se hace necesario el estudio de otras variedades como las algas con posibilidad de uso (Ruíz et al. 2019).

Las clorofilas y carotenos son moléculas solubles en grasas y pueden extraerse de las membranas tilacoides con solventes orgánicos, tales como acetona, metanol o DMSO. En contraste las ficobilinas y la peridina son solubles en agua y pueden extraerse del tejido algal después de haber extraído las clorofilas y carotenoides con solventes orgánicos.

La determinación de la concentración de clorofila-a provee información acerca de la cantidad (biomasa) y actividad fotosintética potencial de la mayor parte del fitoplancton presente en un cuerpo de agua (algas y cianobacterias), con la excepción de las bacterias fotosintéticas, las cuales carecen de dicho pigmento. El metabolito más importante de la clorofila es la feofitina. La relación entre clorofila y feofitina es indicativa del estado fisiológico de las algas (Araiza et al. 2019).

Los picos señalados en la figura 2 representan la longitud de onda de la luz solar donde absorben fuertemente las dos formas de pigmentos fotosintéticos, (clorofila a y clorofila b). Esos pigmentos, absorben predominantemente la luz violeta-azul y la luz roja en dos bandas estrechas del espectro y reflejan la luz verde en la parte media. Los carotenoides absorben principalmente la luz azul y verde, y reflejan la luz anaranjada y amarilla (Motten, A. F., 2004).

Partiendo de lo anterior, el presente protocolo brinda un análisis cuantitativo acerca de la espectrofotometría mediante la relación que existe entre los conceptos de espectro de luz o radiación electromagnética, absorbancia y pigmentos, que se refiere a la absorbancia que originan los pigmentos, en este caso la clorofila extraída de Sargazo.

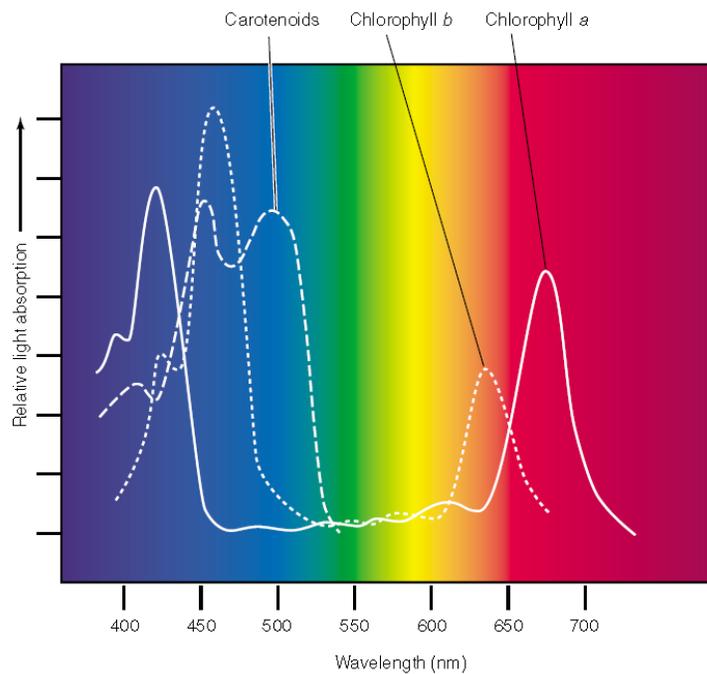


Figura 2. Espectro de absorción de la Clorofila (Figueroa et al. 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

Estimular el aprendizaje a través de la investigación bibliográfica, observación y registro experimental.

Comprender la relación de la pigmentación con el análisis por espectrofotometría UV-Vis.

Identificar los principales pigmentos presentes en organismos fotosintéticos (algas).

Ser capaz de correlacionar el contenido pigmentario de los organismos estudiados con los factores ambientales en que se desarrollan.

Adquirir un conocimiento amplio en la aplicación de la técnica analítica: Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

3. ACTIVIDAD PRELIMINAR

- Investiga y menciona la función que desempeñan cada una de las partes que componen un espectrofotómetro.
- ¿Qué es, para qué sirve y cómo se construye una curva patrón?
- ¿Qué es blanco de calibración y como se realiza su medición en la curva patrón?
- ¿Qué es verificación instrumental y cuáles son los principales parámetros para controlar en un espectrofotómetro?

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Este procedimiento experimental aplicado para la determinación cuantitativa de la clorofila-a es seguido según lo reportado por Hernández, G. E., (2015).

4.1 Material y equipo

- Espectrofotómetro UV-Vis
- Celdas de cuarzo (1 cm)
- Agitador de vidrio
- Mortero de porcelana con pistilo
- Centrífuga
- 3 tubos de centrífuga con tapas de rosca
- Pipetas volumétricas de 1.0 mL, 3.0 mL y 5.0 mL
- 3 Matraces aforados de 10 mL
- Vaso de precipitado de 150 mL
- Pipetas Pasteur
- 2 matraces volumétricos de 10 mL y 5 mL
- Tubos eppendorf
- Espátula

4.2 Reactivos

- Material algal fresco (Sargazo)
- Acetona (en frío) o nitrógeno líquido.
- Acetona al 90% (en frío)
- Hielo
- Agua destilada

4.3 Preparación de la muestra

Tomar 0.5 g de peso fresco del alga (Sargazo). Moler en un mortero con acetona fría (se recomienda tener previamente en congelador el mortero y el pistilo). Moler el tejido hasta pulverizar.

4.4 Preparación de blanco

Se debe analizar un reactivo blanco (acetona) por cada corrida de muestras. Este reactivo es un filtro blanco que se extrae y analiza como cualquier otra muestra, se realiza una medida a 750 nm para determinar la turbidez, la cual se resta de las medidas de las otras absorbancias a 664 y 665 nm.

La celda de cuarzo se lava con acetona al 90% y se llena de acetona para realizar una lectura y corregir la absorbancia debida al disolvente en cada una de las longitudes de onda (Blanco). Se utiliza para determinar la posible contaminación de reactivos o materiales. Apuntar los datos obtenidos.

4.5 Curva de calibración

Cada vez que se realice este procedimiento es necesario realizar una curva de calibración a partir de una solución estándar de clorofila-a (proporcionada por el profesor), utilizando como mínimo 5 puntos con concentraciones entre 1 y 15 mg/L. La solución estándar de Clorofila-a se debe preparar en ausencia de luz de acuerdo con la metodología reportada por Menéndez, M., (2017).

Se transfiere el contenido de la ampolla (1 mg) a un matraz conteniendo 25 mL de acetona al 90 %. Se logra así una concentración de 40 mg/L. Recubrir el matraz con papel de aluminio para protegerlo de la luz.

En la siguiente tabla se muestran las posibles diluciones para realizar la curva de calibración a partir de la solución estándar de clorofila-a, éstas se llevan a un volumen final de 10 mL.

Concentración de la solución a preparar (mg/L)	Toma de la solución estándar (mL)
1	0.25
3	0.75
6	1.5
9	2.2
12	3
15	3.8

Tabla 1. Diluciones y concentraciones para realizar curva de calibración de clorofila-a (Menéndez, M., 2017)

4.6 Verificación instrumental

Solicitar al profesor de asignatura el procedimiento para la verificación del instrumento: espectrofotómetro UV-Visible (uv spectrophotometer, uv 1500pc).

4.7 Determinación analítica de la concentración

- Transferir el tejido pulverizado a un homogeneizador de vidrio. Agregar de 2 a 3 mL de acetona al 90% enfriada en hielo
- Transferir a un tubo de centrifuga. Lavar el mortero con un volumen adicional de 2 mL de acetona y transferir también al tubo de centrifuga; repetir este paso de lavado, si es necesario, hasta que no quede color apreciable en el mortero.
- Centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos. Decantar el sobrenadante en la celda correspondiente para su lectura.

➔ A considerar:

Cualquier compuesto que absorba luz entre 664 y 665 nm puede interferir en la exactitud de las medidas de absorbancia de la muestra.

Una medida mayor a 0,005 U.A. indica una solución poco clara, lo cual se soluciona centrifugando o filtrando la muestra, previo a la lectura hasta que quede incoloro. El valor del máximo de absorbancia del espectro obtenido deberá estar comprendido entre 0.5 y 1.5 unidades.

Todos los pigmentos fotosintéticos son sensibles a la luz. El trabajo se debe realizar con luz tenue y todos los estándares materiales de control de calidad y muestras filtradas se deben almacenar en la oscuridad entre -20 °C y -70 °C para prevenir la rápida degradación. Mientras no es filtrada, la muestra debe ser refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C), en oscuridad.

Realice las mediciones de cada solución por triplicado y registre el valor de absorbancia en su bitácora.

Grafique la curva de calibración Absorbancia vs Concentración, para obtener la concentración de la muestra medida y multiplique por el factor de dilución correspondiente. Evalúe la información obtenida. Observe y registre la información en su bitácora de prácticas.

Analito	λ (nm)	Absorbancia
Clorofila-a	630	
	647	
	664	
	750	

Tabla 2. Lecturas de absorbancia recomendadas para clorofilas. Hernández, G. E., (2015).

5. CUESTIONARIO

- ¿Cuál es la importancia de emplear un solvente orgánico en la extracción de pigmentos?
- ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método espectrofotométrico UV-Vis en la extracción de pigmentos?
- ¿Cuál es la importancia de mantener las muestras en frío y en obscuridad antes de su análisis?
- Menciona la relación que existe entre la Ley de Lambert-Beer y el método espectrofotométrico UV-Vis.
- ¿Cuál es la utilidad de emplear soluciones blanco?
- Investiga e ilustra la estructura química de la clorofila.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Araiza, M. M. J., Balandrano, F. A. L., Hernández, C. J. P., (2019). *Alga Sargazo como posible fuente de materias primas para la extracción de carotenoides*. Memorias del XXI concurso lasallista de investigación, desarrollo e innovación, 21, 25-28. Enero 2021, De CLIDi Base de datos.
- Azcarate, M. P., Kloster, N. S., Ostinelli, M., Carreira D., (2011). *Guía para la verificación de espectrofotómetros uv-visible utilizados en el análisis de suelo y agua*. VI IBEROLAB, 1, 1-4.
- Dosal, M. A. and Villanueva, M., (2008). *Curvas de calibración en los métodos analíticos*. Introducción a la metrología química, 1, 1-9. Enero 2021, De Antología de Química Analítica Experimental Base de datos.
- Figueroa, F. L., Israel, A., Neori, A., Martínez, B., Malta, E. J., Ang, P. J., Inken, S., Marquardt, R., Korbee, N., (2009). *Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in Ulva lactuca (Chlorophyta): responses to short-term stress*. Vol. 7: 173–183. Aquatic biology.
- Hernández, G. E., (2015). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Fitoquímica Marina*. Universidad Autónoma de Baja California, 1, 1-87. Noviembre 2020, De Facultad de Ciencias Marinas de la UABC Base de datos.
- Laboratorio de Equilibrio y Cinética. (2010). *Fundamentos de Espectrofotometría*. Cinética Química, 1, 1-18. Noviembre 2020, De Facultad de Química, UNAM. Base de datos.
- Lara, M. J. V., (2020). *Calificación de operación de espectrofotómetros de absorción atómica*. Centro Nacional de Metrología, Materiales Metálicos, 1, 1-6. Enero 2021, De CENAM Base de datos.
- Lobban, Ch. S. and Harrison, P. J., (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom: Ecological Society of America.
- Menéndez, M., (2017). *Determinación de Clorofila-a y Feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina*. Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales, Versión 5, 1-8. Enero 2021, De Dirección Nacional de Medio Ambiente DINAMA Base de datos.
- Monge, P. S., (2015). *Desarrollo del método para la cuantificación de la clorofila-a en muestras de agua, por espectroscopia ultravioleta visible*. Tesis de Licenciatura. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia.

- Motten, A. F., (2004). *Diversity of photosynthetic pigments in tested studies for laboratory teaching*. Vol. 25 (M. A. O'Donnell, Editor), pp. 159-177.
- Murillo, G. M., (2017). *Proyecto de recolección de sargazo en las costas del acrobe mexicano: diseño y evaluación*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de maestría y doctorado en ingeniería (Ingeniería de sistemas-Ingeniería industrial).
- Ruiz, S. F. L., Ruiz, J. A., Hernández, B. J. A., García, J. R., Valadez, V. A., (2019). *Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Vol. 4, 891-896. Noviembre 2020, De Universidad Tecnológica de Tabasco, División de Procesos Industriales Base de datos.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., (2014). *Fundamentos de Química Analítica*. USA: Cengage Learning.
- Téllez, O. M., Domínguez, D. R., González, Ch. E., (2020). *Conocimiento de técnicas analíticas parte i: fundamentos de espectrofotometría*. Departamento de Físicoquímica, P7, 1-6. Noviembre 2020, De Facultad de Química, UNAM. Base de datos.

PRÁCTICA No. 6

Determinación de antioxidantes en Sargazo utilizando un método espectrofotométrico.

Objetivos

- Realizar la extracción de compuestos antioxidantes de muestras de sargazo.
- Determinar la capacidad antioxidante en muestras de sargazo
- Identificar las aplicaciones de estos compuestos en el área farmacéutica y alimenticia.

Introducción

El sargazo es un género de macroalgas de la clase de algas pardas, las cuales son un reservorio de compuestos biológicamente activos. Algunas especies de estas macroalgas son consumidas como parte de la dieta porque poseen compuestos funcionalmente activos como ácidos grasos omega-6, antioxidantes, carotenoides y compuestos fenólicos (Pinto, 2020).

Los antioxidantes son inhibidores del proceso de oxidación de lípidos, el cual es la mayor causa de algunos efectos patológicos como enfermedades cardiovasculares, cáncer, disfunción cerebral y procesos de envejecimiento. Por lo tanto, el consumo de antioxidantes juega un papel importante en la protección contra estos eventos. Existen antioxidantes sintéticos como el hidroxibutilanisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y el terc-butilhidroquinona (TBHQ), los cuales se encuentran disponibles comercialmente y son muy utilizados actualmente; sin embargo, pueden tener una amplia variedad de efectos adversos, lo cual crea inquietud en su consumo (Ito, 1986; Wattenberg, 1986).

Se sabe que los compuestos fenólicos vegetales poseen actividad antioxidante y tienen la capacidad de eliminar especies reactivas del oxígeno y radicales libres. Actualmente las algas son consideradas como una fuente rica de antioxidantes, por ejemplo, la fucoxantina en *Hijikia fusiformis* (Yan, 1999), y los florotaninos en *Sargassum kjellmanianum* (Yan, 1996). En consecuencia, el desarrollo de antioxidantes alternativos de origen natural ha atraído cada vez más atención.

Con el fin de valorar la eficacia de los antioxidantes se han desarrollado diferentes métodos que se fundamentan en diferentes mecanismos. La mayor parte de los métodos se basan en una reacción de transferencia de un electrón (SET por sus siglas en inglés), o en una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés) entre un antioxidante y el radical libre. Dentro de los métodos que se basan en el mecanismo SET, en los que se valora la capacidad reductora del antioxidante, uno de los más utilizados es el método de FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica, por sus siglas en inglés) (García, 2011).

Capacidad reductora del hierro férrico/poder antioxidante. Método de FRAP (de sus siglas en inglés):

El método de FRAP se trata de un método espectrofotométrico que mide la reducción de un complejo formado por un cromógeno, normalmente de TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) y hierro férrico incoloro (Fe^{3+}) a un complejo ferroso (Fe^{2+}) de un intenso color azul verdoso en presencia de antioxidantes en un medio ácido (Huet, 2017).

La reacción del hierro férrico (Fe^{3+}) con un antioxidante (RH) genera la forma reducida que absorbe luz a 620 nm, y el donante de electrones oxidado, representado por R^\bullet en la **Fig.1**. (Tomasina, 2012).

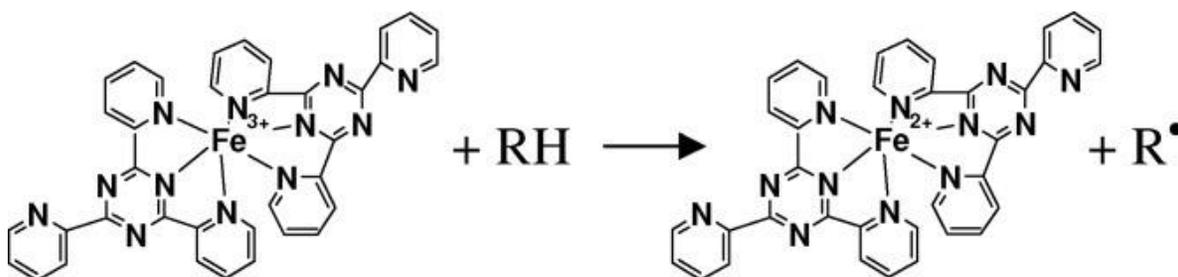


Fig. 1: Reacción del método de FRAP. Tomado de: Tomasina, 2012.

Cuestionario previo

- ¿Qué tipo de reacción es la que se lleva a cabo en el método de FRAP?
- Identifique el agente oxidante y reductor en la reacción del método de FRAP
- ¿Cuáles son los estándares que se pueden utilizar para esta prueba espectrofotométrica?
- ¿Qué otras pruebas para determinar actividad antioxidante existen?

Material, equipo y reactivos

-
- | | | |
|------------------------|---------------------|--------------------------------|
| ▪ Espectrofotómetro | ▪ Agua destilada | ▪ Reactivo FRAP: TPTZ |
| ▪ Celdas de cuarzo | ▪ Etanol | 10 mM en ácido |
| ▪ Balanza analítica | ▪ Estándar de ácido | clorhídrico 40 mM, |
| ▪ Espátula | gálico | buffer de acetatos 300 |
| ▪ Vaso de precipitados | ▪ Muestras de | mM (pH=3.6) y cloruro |
| de 5 mL, 10 mL | sargazo | férrico (20 mM). Se |
| ▪ Matracas aforados de | | debe preparar el día |
| 5 mL y 50 mL | | de trabajo y calentar a |
| ▪ Pipetas volumétricas | | 37°C antes de su uso. |
| de 5, mL | | |
| ▪ Micropipeta de 0-50 | | |
| µL | | |
-

Metodología

Preparación de reactivos

Para preparar el reactivo del método de FRAP se utilizan los siguientes reactivos en una relación (1:1:10) respectivamente:

- TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM
- Cloruro férrico (20 mM)
- Buffer de acetatos 300 mM (pH=3.6)

Preparación de la muestra

1. La muestra se somete a un secado en horno a 50°C durante 24 horas, se pulveriza y almacena en congelación hasta su análisis.
2. **Para todo el grupo:** Suspender 5 g de la muestra de sargazo seca previamente en 50 mL de etanol, colocar en un agitador por 24 horas a temperatura ambiente.
3. Después de 24 horas, se filtra y se almacena en refrigeración hasta su uso.

Curva de calibración

1. Calcular la cantidad de estándar de ácido gálico para preparar una solución madre de 1000 mM.
2. A partir de la solución madre, realizar los cálculos necesarios para preparar 10 mL de las siguientes disoluciones: 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mM.
3. Para realizar la prueba de actividad antioxidante FRAP se añaden 3 mL del reactivo FRAP (formado por la solución de TPTZ 10 mM, cloruro férrico 20 mM y buffer de acetatos 300 mM (pH=3.6)), recién preparado y 50 µL del estándar.

4. Mezclar e incubar la reacción por 4 minutos a 37°C.
5. Posteriormente se determina la absorbancia a 593 nm en el espectrofotómetro, utilizando un blanco de etanol.
6. Considerando los resultados de absorbancia y las concentraciones del estándar, construir curva de calibración (*NOTA:* Verificar que $R^2 \geq 0.9$, en caso de que más de una persona participe en la elaboración de la curva puede considerarse que el coeficiente de correlación se encuentre en el siguiente intervalo $0.8 \leq R^2 \leq 0.9$)

Determinación de antioxidantes en el extracto

1. Para realizar la prueba FRAP en el extracto se añaden 3 mL del reactivo FRAP (formado por la solución de TPTZ 10 mM, cloruro férrico 20 mM y buffer de acetatos 300 mM (pH=3.6)), recién preparado y 50 μ L del extracto.
2. Mezclar e incubar la reacción por 4 minutos a 37°C.
3. Posteriormente se determina la absorbancia a 593 nm en el espectrofotómetro, utilizando un blanco de etanol (*NOTA:* Verificar que el resultado de absorbancia se encuentre dentro de los valores obtenidos en la curva de calibración, de lo contrario, deberán realizarse diluciones del extracto y llevar a cabo nuevamente la reacción con el reactivo FRAP).
4. Con los datos de absorbancia, llevar a cabo una interpolación en la curva de calibración y determinar la actividad antioxidante del extracto. Los resultados se expresan como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de alga seca (mg GAE/g de muestra seca)

Resultados

- Cálculos para determinar la curva patrón del ácido gálico.
- Gráfico de la curva patrón con datos de pendiente, ordenada al origen y R^2 .
- Cantidad de antioxidantes reportado como mg GAE/g de muestra seca.

Cuestionario final

1. Con la cantidad de antioxidantes obtenidos en la muestra, ¿en qué productos de la industria farmacéutica y/o alimenticia pueden utilizarse estos compuestos?
2. ¿Qué otras aplicaciones se le podrían dar a estas macroalgas?
3. ¿Por qué el sargazo es considerado un problema ambiental?

Bibliografía

- García, J. R., De La Rosa, L. A., González Barrios, A. G., Herrera Duenez, B., López Díaz, J. A., González-Aguilar, G. A., Ruiz Cruz S., Álvarez Parrilla, E. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua*, 5(2), 67-75.
- Huet Breña, C. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Universidad Complutense, Facultad de Farmacia.
- Ito, N.; Hirose, M.; Fukushima, S.; Tsuda, H.; Shira, T.; Tatematsu, M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, 1071-1082.
- Pinto, D. C. (Ed.). (2020). *Seaweeds Secondary Metabolites: Successes in and/or Probable Therapeutic Applications*. MDPI.
- Tomasina, F., Carabio, C., Celano, L., Thomson, L. (2012). Analysis of two methods to evaluate antioxidants. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(4), 266-270.
- Wattenberg, L. W. Protective effects of 2(3)-tert-butyl-4- hydroxyanisole on chemical carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, 1099-1102
- Yan, X. J.; Chuda, Y.; Suzuki, M.; Nagata, T. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1999, 63, 605-607
- Yan, X. J.; Li, X. C.; Zhou, C. X.; Fan, X. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J. Appl. Phycol.* 1996, 8, 201-203
- Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In *Handbook of antioxidants for food preservation* (pp. 287-333). Woodhead Publishing.

PRÁCTICA No. 7

Análisis cuantitativo de hierro contenido en sargazo

I. Introducción

I.1 Fundamento de la técnica analítica

La espectroscopia de absorción atómica es una técnica que sirve para la determinación cuantitativa de un elemento metálico en una muestra. Se basa en la absorción de la radiación de energía por los átomos libres a una longitud de onda determinada a una longitud de onda determinada. La radiación es absorbida de manera selectiva, por los átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia energética corresponda al valor de energía de los fotones incidentes. La ley de Lambert-Beer determina la cantidad de fotones absorbidos, que relaciona la pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda que contiene los átomos absorbentes (Rocha, 2000).

Se analiza el átomo, el cual está rodeado de electrones. Cada elemento tiene un número determinado de electrones, los cuales ocupan orbitales definidos. La configuración electrónica conocida del átomo corresponde al estado de energía más bajo, conocido como estado basal. Si se aplica la energía adecuada a un átomo y un electrón externo será promovido a un estado menos estable o estado excitado. Este último estado es muy inestable, el átomo de forma inmediata y espontáneamente regresará a su posición estable y se emitirá una energía radiante equivalente a la cantidad de energía absorbida inicialmente en el proceso de excitación (Skoog et al., 2010).

Si una longitud de onda determinada emite luz y esta incide sobre un átomo libre en estado basal, el átomo absorberá energía y va a pasar a un estado de mayor energía, es decir estará excitado, a este proceso se le llama absorción atómica. Esta propiedad de un átomo para absorber luz de una longitud de onda específica es utilizada en esta técnica (Harris, 2012).

La cantidad medida de interés en absorción atómica, es la medida de la luz a una determinada longitud de onda, la cual es absorbida cuando la luz pasa a través de una nube de átomos. Cuando el número de átomos en la trayectoria de la luz se incrementa, la cantidad de luz absorbida incrementa en una forma predecible. Al medir la cantidad de luz absorbida, se puede determinar de forma cuantitativa la cantidad de elemento presente. Se hace uso de fuentes de luz especiales y una cuidadosa selección de longitud de onda permite la determinación cuantitativa de los elementos individuales en la presencia de otros. La nube de átomos requerida para mediciones de absorción atómica es producida proporcionando la energía térmica suficiente para la disociación de los compuestos químicos en átomos libres.

La luz a la longitud de onda específica con una intensidad inicial (I_0), se enfoca en la flama que contiene átomos en estado basal. La intensidad de luz inicial es disminuida por una cantidad determinada de concentración de átomos en la flama. La luz es dirigida a un detector donde la intensidad reducida (I), es medida. La cantidad de luz absorbida es determinada al comparar I e I_0 (Harris, 2012).

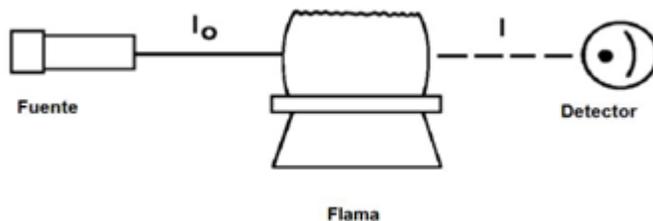


Figura 1. Proceso de absorción atómica (Sánchez, C. E., 2016)

La absorbancia es el término que más conviene para caracterizar la luz absorbida en la espectrofotometría de absorción, pues esta cantidad tiene una relación lineal con la concentración:

La Absorbancia (A), es una cantidad puramente matemática:

$$A = \log(I_0/I)$$

La ley de Beer define esta relación:

$$A = abc$$

Donde:

A= Absorbancia

a= coeficiente de absorción, la cual es una característica de las especies absorbentes a una longitud de onda específica.

b= longitud del paso de la luz ocupado por la celda de absorción

c= Concentración de las especies que absorben en la celda de absorción

Esta ecuación establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente para un conjunto dado de condiciones instrumentales (Skoog et al., 2010).

Cuando la absorbancia de las soluciones patrón de concentraciones conocidas del analito se mide y se realiza una gráfica de absorbancias con respecto a la concentración se obtiene una curva de calibración.

En la región en la cual se observa la relación de la ley de Beer, la calibración produce una línea recta (Skoog et al., 2010).

Después de establecer la calibración, se mide la absorbancia de las soluciones de concentración desconocida y su concentración directamente a la curva de calibración (Harris, 2012).

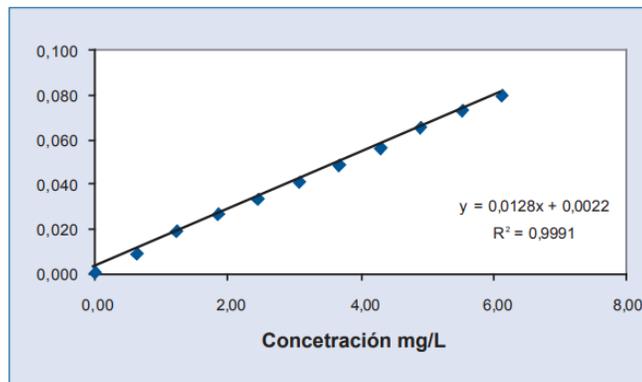


Figura 2. Curva de calibración para la determinación de hierro (Peñuela, O., 2005)

I.2 Aplicación de la técnica utilizada

La absorción atómica es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de metales, el hierro elemental es esencial para las algas para producir enzimas que sean capaces de facilitar el consumo de nutrientes (Ohtake et al., 2020). El sargazo es un alga que al ser utilizada como fertilizante orgánico ha mostrado en cultivos de tomate el suministro de metales como Fe, Na, K, Mg, Ca y Zn, los cuales aumentan la porosidad y la capacidad de retención del agua y hacen que haya un incremento en el crecimiento en general. El sargazo utilizado como fertilizante orgánico provee varios macros y micros nutrientes, los cuales son requeridos para el crecimiento saludable y un mejoramiento en el rendimiento del cultivo de tomate (Kumari et al., 2013). Además, el Fe ayuda en los alimentos para que las personas que sufren anemia puedan mejorar en esta enfermedad, de ahí que el sargazo cobre una gran importancia en su uso como fertilizante orgánico (González et al., 2005).

El hierro es requerido por el organismo en cantidades muy pequeñas, razón por la cual se considera un micronutriente, cuya función es la de formar al grupo hem de la hemoglobina encargada de transportar oxígeno en el organismo (Silva, 2005).

Debido a que el consumo de hierro es importante para prevenir enfermedades como la anemia, por eso es por lo que debe ser cuantificado ya que al utilizar algas como fertilizantes, son una fuente de hierro a los cultivos que sirven de alimento (Silva, 2005).

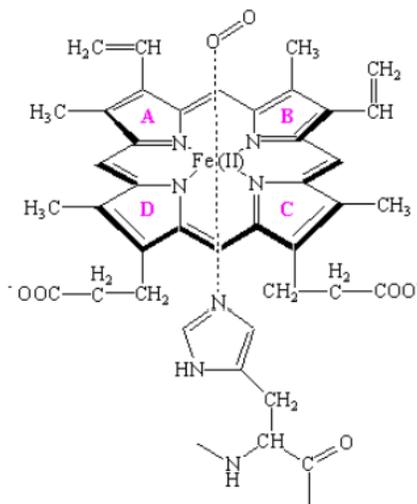


Figura3. Estructura del grupo hem (Peñuela, O., 2005)

Absorción atómica (Gadzhieva, 2016)

Condiciones de trabajo propuestas

Equipo: Thermo Scientific iCE 3300 AA

Wavelength 248.3 nm

Lamp Current 75%

Band pass 0.5 nm

Signal Continuous

Flame type Air Acetylene

Fuel Flow rate 0.9 L/min

Replicates 3 times

Measurement 4 s

Intervalo de trabajo para la determinación de hierro

Desde 0.5 a 10 mg/L

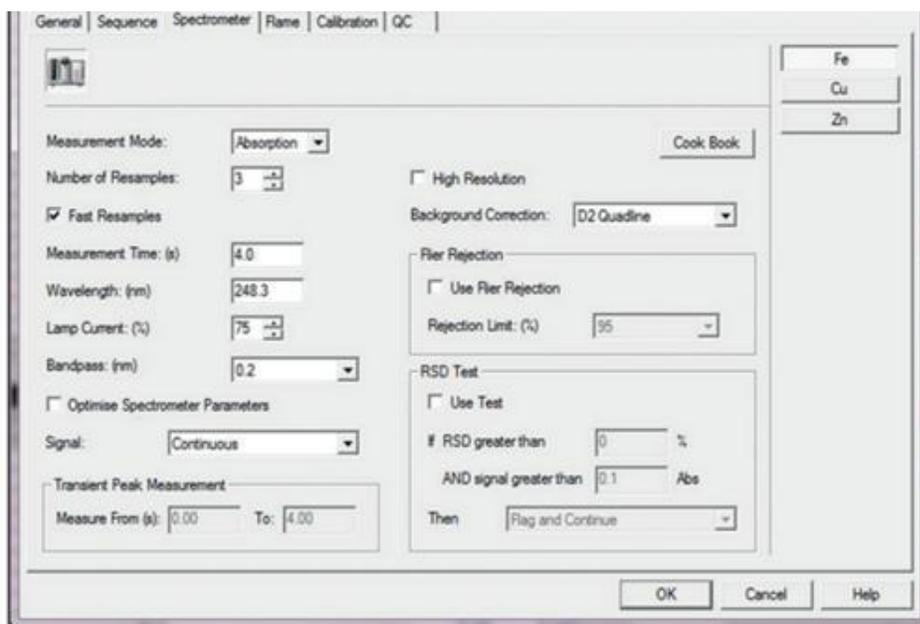


Figura 4. Condiciones recomendadas para la determinación de hierro, mediante Espectroscopia de absorción atómica (Gadzhieva, 2016).

II. Objetivos

- Introducir al alumno a la aplicación de la técnica analítica: Espectrometría de absorción atómica
- Estimular el aprendizaje a través de la investigación bibliográfica, análisis y experimentación
- Determinar el contenido de elementos metálicos presentes en el alga sargazo utilizando la técnica analítica espectroscopia de absorción atómica.
- Aplicar sus conocimientos teórico-prácticos al tema de la práctica.

III. Actividad preliminar

Elaborar un esquema que desglose, represente y relacione los diversos conceptos relacionados con la práctica.

Definir un intervalo lineal, para ello consultar el manual del instrumento el rango específico del instrumento analítico a utilizar.

De acuerdo con el intervalo lineal intrínseco del instrumento analítico: Proponga la concentración de los estándares de hierro a emplear en la curva de calibración. Elabore el diseño experimental para la preparación a partir de la disolución stock de 1000 mg/L.

¿Cuál es el estimado en concentración (mg/L) de Fe en la muestra original?

***Notas:**

- Para el diseño experimental, se sugiere confirmar con el profesor de la asignatura la información de la figura 4 del presente documento.

- Consulte el siguiente link para obtener la información elemental requerida:

<https://iupac.org/what-we-do/periodic-table-of-elements/>

IV. Procedimiento experimental

Siga las indicaciones del profesor de la asignatura para la operación básica del equipo e instrumentación analítica a utilizar.

Material, equipo e instrumentos

Espectrómetro de absorción atómica: Thermo Scientific iCE 3300 AA

Quemador de aire acetileno

Lámpara de cátodo hueco de cobre

Parrilla de calentamiento con agitador

Embudo de filtración rápida

Papel filtro Whatman No.

Vaso de precipitados

Vidrio de reloj

Matraz volumétrico
Campana de extracción
Magneto de agitación

Reactivos

Gas acetileno grado comercial
Aire comprimido
Ácido nítrico 2 % m/v
Ácido nítrico al 70 % m/v
Disolución Stock de Fe a 1000 mg/L

*Nota: Utilice para la experimentación: Agua tipo: _____ y la calidad de los ácidos grado:

IV.1 Preparación de la muestra

Actividades

Poner a secar al aire la muestra de alga hasta peso constante tomar y mezclar 0.5 g de muestra sólida y someterla a una digestión ácida en un matraz de 40 mL agregar la muestra 0.8 mL de ácido nítrico 70% y completar el volumen hasta 40 mL con agua desionizada. Programe a 60°C durante 30 min. Reponer el volumen con agua desionizada a 40 mL entonces filtre a un poro de 45 µm (Soto et al., 2015).

Calcule la concentración (mg/L) de Fe en la solución resultante del procedimiento de digestión, realizando los cálculos necesarios (Soto et al., 2015).

¿Cuál es el factor de dilución a emplear de la solución digerida, para analizar la muestra en concentración estimada dentro del intervalo lineal del instrumento analítico a emplear? Prepare la muestra en la dilución correspondiente, empleando agua: _____ como diluyente (Soto et al., 2015).

IV.2 Preparación de las disoluciones estándar: Método de calibración externo (Soto et al., 2015).

- Los intervalos de linealidad para el hierro (Fe), están entre 0.5 y 8 mg/L
- Preparar 100 mL de una disolución patrón de 1000 mg/L afora con HNO₃ al 2% m/v.
- A partir de la solución patrón diluciones estándar de 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 mg/L.
- Se prepara un blanco con HNO₃ al 2 % v/v.
- Solución de digestión de sargazo

Manejo del espectrómetro de absorción atómica

Trabajar el espectrómetro, provisto de una lámpara multielemental para Fe, Cu, Cr, Ni, Mn y Co en modo "Energy" a una longitud de onda de 248.3 nm y una corriente de 5 mA. a encender el atomizador (llama aire acetileno oxidante). Aspirando la disolución de hierro de mayor concentración y trabajando en modo "Energy" se posiciona el mechero nebulizador y se ajusta el caudal de aspiración de tal manera que se obtenga la mayor intensidad de energía. Finalmente, al aspirar la disolución blanco se hará el cero de la absorbancia. Después se mide la absorbancia de las disoluciones estándar y de la muestra trabajando en modo "Data". La concentración de la muestra se hace por interpolación en la recta de calibrado a partir de las áreas de las disoluciones estándar medidas (Silva, 2009).

RESULTADOS

Curva de calibración

Solución	Concentración (mg/Kg)	Absorbancia
1		
2		
3		
4		
5		

Muestras

Muestra	Absorbancia	Conc. [mg/L]
1		
2		
3		

Concentración promedio de hierro en la muestra: _____ mg/L

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se debe tener la muestra totalmente seca?
2. ¿Por qué se lleva a cabo la digestión con ácido sulfúrico?
3. ¿Cuáles son los principales componentes de absorción atómica y cuáles son sus funciones?
4. ¿Cuáles son los diferentes tipos de calidad de agua?
5. ¿Qué tipo de agua se utiliza para absorción atómica?
6. Pregunta a tus compañeros los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de tus analitos e informa de la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados

BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz, J., Santana, J. (2009). Cuantificación de hierro, zinc, calcio y vitamina "A" en leche de soya en polvo, de tres marcas comercializadas en los alrededores del centro urbano "José Simeon Cañas". (Tesis de licenciatura). El Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Salvador
2. Gadzhieva, A. (2016). Iron, copper and zinc determination in wine using flame atomic absorption spectroscopy. Thermo scientific. Application note 43189
3. Gonzáles, Urrutia. (2005). Biodisponibilidad del hierro. Rev. Costarric. Salud pública, 14(26), 1-6
4. Harris, D. C. (2012). Análisis químico cuantitativo, 3ª Edición, España: Reverté.
5. Kumari, R., Kaur, I., Bhatnagar, A. K. (2012). Enhancing soil health and productivity of *Lycopersicon esculentum* Mill. Using *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner as a soil conditioner and fertilizer. *Journal of Applied Phycology*, 5(2013), 1225-1235
6. Mahmoud, S. H., Salama, D. M., El Thany, A. M., Abd El Samad, e. h. (2019). Utilization of seaweed (*sargassum vulgare*) extract to enhance growth, yield and nutritional quality of red muticum (*phaeophyceae*). *journal of oceanology and limnology*, 37(3), 918-928
7. Ohtake, M., Natori, N., Sugai, Y., Tsuchiya, K., Aketo., Nishihara, G., Toda, T. (2020). Growth and nutrient uptake characteristics of *Sargassum macrocarpum* cultivated with phosphorus-replete wastewater. *Aquatic Botany* 163 (2020) 103208
8. Peñuela, O. (2005). Hemoglobina: Una molécula modelo para el investigador. *Colombia médica*: 36(3); 215-225
9. Nurcaya, e., rianingsih, I., Dwi, A. (2019) the addition of different starters on characteristics *sargassum* sp. Liquid fertilizer. *IOP Conf. Series and Environmental Science* 246, 012045, 1-8
10. Silva, P. (2009). Validación de la metodología analítica para la cuantificación de hierro por espectroscopia de absorción atómica de llama en alimentos de la canasta básica costarricense. *Tecnología en marcha*: 22(2); 20-22
11. Rocha, E. (2000). Principios básicos de espectroscopia. México: Universidad Autónoma de Chihuahua.
12. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2010). Fundamentos de química analítica, 8ª Edición. México: Cengage Learning.
13. Sánchez, C. E. (2016). Determinación de metales pesados en muestras de diferentes tipos de residuos líquidos mediante la técnica de espectroscopia de absorbancia atómica (Tesina, grado de Especialista en Ingeniería Sanitaria). Facultad de Ingeniería. UNAM

Determinación de Ácidos Grasos Poliinsaturados en Alga Sargassum

I. Introducción

I.1. Fundamento de la técnica analítica

La Cromatografía de gases (CG) se basa en la separación de los componentes distribuidos en dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que el otro (fase móvil) se mueve en una dirección definida. Los compuestos pueden ser analizados en su forma nativa, mientras que otros necesitan ser químicamente derivado para hacerlos suficientemente volátiles, menos polar, y/o más estable térmicamente. Los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de su reparto entre una fase móvil gaseosa y otra fase estacionaria líquida o sólida mantenida en una columna. Al realizar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se logra mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de muchos otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, sino que su única función es transportar el analito a lo largo la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases: cromatografía de gas-líquido (CGL) y la cromatografía de gas-sólido (CGS). La primera es de amplio uso en todos los campos de la ciencia y su nombre suele abreviarse a **Cromatografía de gases (CG)**. La de gas-sólido se basa en una fase estacionaria sólida, donde la retención de los analitos ocurre como resultado de una adsorción física. Esta variante ha tenido aplicación limitada debido a la retención semipermanente de moléculas activas o polares y a que los picos de elución suelen presentar grandes colas (consecuencia de la naturaleza no lineal del proceso de adsorción).

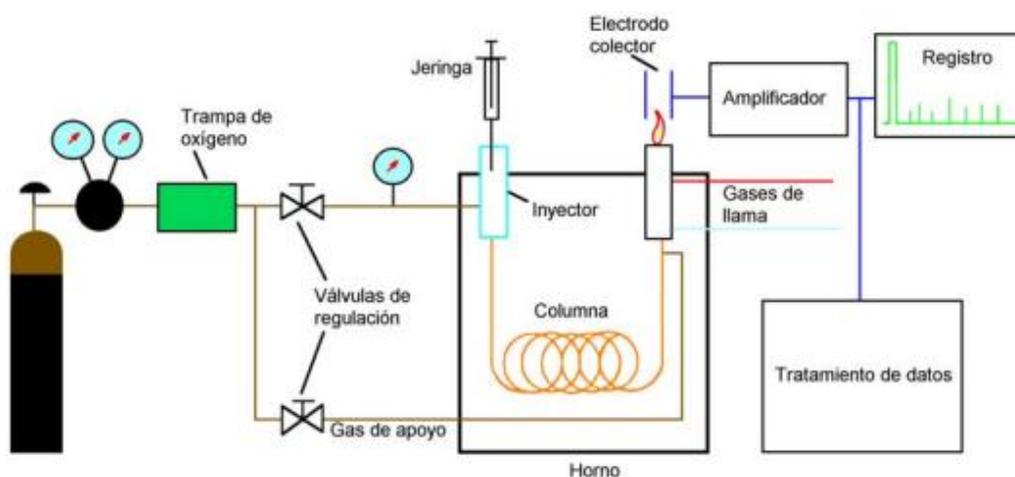
La cromatografía de gas-líquido se basa en el reparto del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte o en las paredes del tubo capilar.

La técnica de una cromatografía de gases se basa en inyectar una cantidad de muestra en una corriente de gas inerte a temperaturas elevadas, esta corriente de gas atraviesa la columna cromatografía que será la encargada de separar los componentes de la mezcla mediante partición (cromatografía gas sólido) o adsorción (cromatografía gas sólido) o mediante una mezcla de ambos, una vez que los componentes sean separados en diversos intervalos estos serán detectados y dirigidos a un dispositivo de recolección de muestras llevándose a cabo un registro de los componentes mediante un cromatograma.

A continuación, se describen los componentes principales de un cromatógrafo de gases:

1. Botella de gas portador, en él se va a contener la fase móvil

2. Válvulas de Regulación de presión
3. Trampas de oxígeno como identificadores de la presencia de O₂
4. Inyector el cual contiene un sistema de control de temperatura
5. Columna cromatográfica que se encuentra localizada en el horno
6. Detector
7. Sistema de registro



Uniquim, cromatografía de gases (<https://uniquim.iquimica.unam.mx/glossary/cromatografia-de-gases/>)

Figura 1. Esquema de un cromatógrafo de gases

La información obtenida de un análisis cromatográfico incluye un cromatograma (una imagen gráfica de la salida de un detector), que nos da información sobre las alturas y las áreas de los picos *resueltos* (adecuadamente separados), su identidad molecular, etc.

I.2 Aplicación de la técnica analítica

La **cromatografía de gases (GC)** es una técnica de separación para la caracterización de mezclas complejas y presenta una aplicación analítica importante en la ciencia con el propósito de obtener información sobre sus composiciones moleculares y cantidades mediante un análisis rápido y exacto de gases.

- ✓ Medioambientales: Análisis de pesticidas y herbicidas, análisis de hidrocarburos, semi volátiles y volátiles, análisis del aire, etc.
- ✓ Alimentos y aromas: fragancias y aromas, aceites, bebidas, ácidos orgánicos, azúcares, Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAMES), triglicéridos, alcoholes, etc.
- ✓ Química Industrial: alcoholes, ácidos orgánicos, aminas, aldehídos y cetonas, ésteres y glicoles, hidrocarburos, disolventes, anilinas, gases inorgánicos, etc.

- ✓ Biociencia: drogas, fármacos, alcoholes y contaminantes en sangre, disolventes residuales, etc.
- ✓ Derivadas del petróleo: gas natural, gases permanentes, gas de refinería, gasolinas, gasóleos, parafinas, etc.

La cromatografía de gases es aplicable a especies que posean una apreciable volatilidad y estabilidad térmica. La complejidad de identificar y cuantificar la presencia de compuestos de interés ha sido indispensable en la ciencia forense para separar sustancias de interés como el análisis de los residuos de fuego al igual que lo es el análisis de drogas, análisis de sangre y otros fluidos corporales.

Una aplicación importante es la determinación de los ácidos grasos por su relación con el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, el estudio del perfil de los ácidos grasos en las principales grasas es de gran importancia. La identificación y clasificación de estas grasas depende estrictamente de su composición en ácidos grasos. Por ejemplo, en las grasas animales como el sebo, el aceite de pollo y la manteca de cerdo hay un alto contenido de ácido esteárico y mirístico en comparación con las grasas vegetales. Este es un buen indicador de la pureza de las materias primas.

II. Objetivos

- Conocer e identificar las partes básicas de un cromatógrafo de gases
- Comprender el principio y funcionamiento de la cromatografía de gases
- Que el alumno obtenga la información necesaria de un cromatograma para realizar un análisis cualitativo
- identificar ventajas y limitaciones de la técnica de cromatografía de gases

III. Actividad preliminar

1. ¿Cuál es el fundamento de la CG (gas líquido y gas sólido)?
2. ¿Qué tipo de sustancias se pueden determinar por medio de esta técnica?
3. ¿Qué tipo de compuestos se emplean como fase estacionaria?
4. Mencionar los componentes básicos de un cromatógrafo de gases y explicar brevemente la función de cada uno de ellos
5. ¿Qué es un cromatograma y qué información puedo obtener?

IV. Procedimiento Experimental

IV.1. Material, equipo e instrumentos

- Cromatografo de gases
- Equipo Soxhlet
- 1 refrigerante
- 1 embudo Buchner
- 1 desecador
- 2 vasos de precipitado de 50ml
- 1 vaso de precipitado de 100ml
- 1 embudo de decantación
- 1 Jeringa de 10µl para cromatografía de gases.
- 10 g de Sargazo seco y molido
- Sulfato de sodio Anhidro
- KOH 2M
- Hexano

IV.2. Preparación de la muestra

Muestra algal

1. Secar el material algal en estufa a 60°C durante 48h o secar al aire libre durante 3 días.
2. Tamizar la muestra seca con un tamaño de partícula de 1.0 mm

IV.3. Extracción de lípidos

1. Pesar 2g de muestra algal
2. Verter en un cartucho para extracción Soxhlet
3. Agregar 150ml de hexano en el refrigerante para mantener la recirculación del solvente
4. Llevar a cabo la extracción durante 3 horas
5. Recuperar el éter y evaporar el éter residual sobre baño maria
6. Secar el residuo a 100°C durante 30min
7. Enfriar en desecador y pesar
8. Eliminar el exceso de solvente a baño maria

IV.4. Esterificación de ácidos grasos

1. Pesar 0.2g del aceite del alga obtenido
2. Disolver en 4ml de hexano y agitar hasta disolución de la grasa
3. Adicionar 0.2ml de KOH (en metanol) 2M
4. Agitar y dejar reposar por al menos 30 min
5. Centrifugar a una velocidad de 200rpm durante 5 minutos

Nota: La preparación y extracción de la muestra se deberá realizar una sesión anterior al análisis de la muestra.

IV.4. Análisis de la muestra

Para el análisis de la muestra se tomará como estándar comercial la mezcla de ácidos grasos (kit) EC10A-1KT el cual contiene ácidos grasos que se encuentran dentro del alga.

El GC a utilizar es el Shimadzu GC-14B equipado con un detector de ionización de llama (FID) y columna capilar de sílice fundida Omega wax-320 (30 m 0,32 mm i.d.).

A continuación, se describen los pasos a seguir para la cromatografía de gases:

1. Encender el cromatógrafo de gases y comprobar las presiones de salida en las bombas de gases.
2. Inyectar 1µl de la muestra en el cromatógrafo
3. Fijar temperatura inicial de la columna en 120°C durante 1 minuto después de la inyección
4. Aumentar a una velocidad de 15°C/min hasta una temperatura de 180°C mantener durante 1 minuto
5. Incrementar temperatura continuamente de 2°C/min hasta 200°C mantener temperatura 1 minuto
6. Aumentar velocidad de 10°C/min hasta 260°C y mantener como temperatura final
7. Tome en cuenta que el equipo requiere al menos 1h de calentamiento previo con el fin de estabilizar la temperatura de la columna, el flujo de gas acarreador y detector.

El gas portador a utilizar es Helio con un caudal de 1ml/min.

V. Análisis de resultados

1. Determinación de áreas de los picos de ácidos grasos y el estándar interno en una curva de calibración previamente preparada.
2. Elaboración de una gráfica de concentración contra relación de área, la relación de área se obtiene al dividir el área del pico del ácido graso entre el área del pico del estándar interno.
3. Obtención de la ecuación de la curva y coeficiente de correlación.

VI. Cuestionario

1. ¿En que se basa la cromatografía de gases?
2. ¿Qué resolución y cuáles son los criterios para medir la eficiencia de separación de los componentes de una mezcla?
3. ¿Cómo puede medirse la eficiencia de una columna?
4. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de las columnas empacadas?
5. Explicar que se entiende por factor de respuesta.
6. Explicar que es el patrón interno y el externo para la identificación de los componentes de una muestra.

VII. Bibliografía

- Cerón, a. Et al.(2012). Identificación de ácidos grasos presentes en el aceite extraído a partir de semillas de guanábana (*annona muricata*). Revista de ciencias agrícolas 29 (1): 81 - 87
- Duarte, g. et al., práctica No 1 Determinación de parámetros cromatográficos en cromatografía de gases. Métodos Cromatográficos. Departamento de Química Analítica.
- Fuentes, p. (2018-2019). Tesis de maestría: determinación de ácidos grasos por cromatografías de gases para la diferenciación de nueces (junglas regia) según su origen. Producción agroalimentaria. Pp. 1-52
- Guiones de prácticas cromatografías de gases. Métodos en Biotecnología. UNAM. pp. 1-46
- Harold M. Mcnair. (1981). Cromatografía de Gases. Secretaría general de la organización de los estados americanos (oea) Washington, D.C.
- Lopez, j. et al.(2009). Estandarizacion de analisis de metilesteres de ácidos grasos por la tecnica de cromatografia de gases acoplada a espectrometria de masas. Scientia et technica año xv, no 43, pp. 228-233
- Narayan, et al (2013). Comparative evaluation of fatty acid composition of different sargassum (fucales, phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. Journal of aquatic food product technology 13(4), 53-70
- NMX-F-017-SCFI-2011. Alimentos – aceites y grasas – determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases en columna empacada – método de prueba.
- Rohani, et al (2011).Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the persian gulf of iran as potential food and feed resources. Journal of Food Scientists & Technologists 49 (6), 774–780.
- Rodrigues, d. et al., (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from buarcos bay in central west coast of portugal. Food Chemistry 183 pp.197-207
- Rubinson, Kenneth y Rubinson, Judith (2001) Análisis instrumental, Prentice- Hall. España.
- Skoog ,Holler y Nieman. Principios de análisis instrumental. Quinta ed. Editorial Mcgraw Hill 2001.
- Olguín, I & Rodríguez h, (2004). Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Química 2do curso.
- Verde c. J. R., escamilla h. M. L., reyes d. A. Malpica s. F. (1999). Manual de prácticas de química analítica II. Uam-I



Agradecimiento Académico:

Jefatura del Departamento de Química Analítica

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Colaboradores Académicos PAPIME PE210820

Mta. Iliana Zaldívar Coria

Dra. Olivia Zamora Martínez

Dra. Flora Emperatriz Mercader Trejo

Dr. Raúl Herrera Basurto

Dr. José Luis Galván Madrid

Universidad Politécnica de Santa Rosa de Jáuregui (UPSRJ)

Universidad Tecnológica de Querétaro (UTEQ)

Total Metrology in Chemistry (TMiC)

LANGEM, Instituto de Geología, UNAM

Instituto Tecnológico de