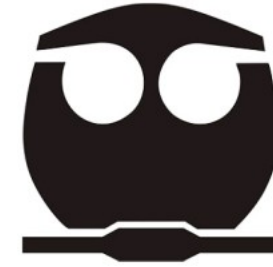




Proyecto
Química Analítica Sustentable y
Espectrofotometría (Rango Visible)
PAPIME 205822



“Seminario de Docencia e Investigación Formativa”

Carrera. Química de Alimentos

Depto. Química Analítica

Estancia Estudiantil (1906)

Semestre 2022-II

Alumno: Dimas Ramírez Sebastián

Tutora: Dra. María Teresa de Jesús Rodríguez Salazar

- Espectrofotometría.
- Métodos espectrofotométricos.
- Ley de Lambert-Beer.
- Estudios reportados empleando química verde y espectro visible.
- Propuesta de aplicación analítica para el prototipo en el área de alimentos.
- Conclusiones.
- Agradecimientos.
- Bibliografía.

Métodos espectrofotométricos

Son un grupo de métodos analíticos que se basan en la espectroscopía atómica y molecular.

Los métodos que más se utilizan se basan en la **radiación electromagnética**, que es un tipo de energía que adopta varias formas. Así, la espectrofotometría es el conjunto de procedimientos que utilizan la luz (una región de radiación electromagnética) para medir concentraciones químicas. (Aguilar M., 2018)

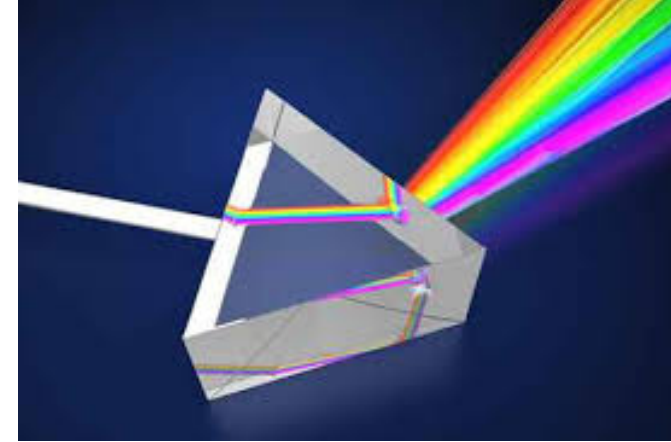


Imagen 1. Prisma refraccionando luz

La **radiación electromagnética** se describe por medio de un modelo ondulatorio. Este fenómeno ondulatorio no requiere medio de soporte para su transmisión, por tanto pasa con facilidad por el vacío.

Desde el punto de vista de energía, es conveniente concebir la radiación electromagnética como partículas llamadas, **fotones**. Cada fotón transporta la **energía**. (Aguilar M., 2018).

$$E = hv = \frac{hc}{\lambda}$$

Ecuación 1

Donde:

h = es la constante de Planck (igual a 6.62618×10^{-34} J s).

v = frecuencia (s^{-1}) que corresponde al número de oscilaciones completas de una onda en un segundo.

c = velocidad de la luz ($2,998 \times 10^8$ m/s en el vacío).

λ = longitud de onda.

Imagen 2. Fórmula para evaluar la energía (Aguilar M, 2018)

ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis



Es principalmente una técnica analítica cuantitativa relacionada con la absorción de radiación en la región del ultravioleta cercano o visible por especies químicas en solución o en fase gaseosa.

La **región visible**, a la que es sensible el ojo humano, se localiza entre los **380 y 780 nm**. (Aguilar M., 2018).

Estas regiones del espectro electromagnético proporcionan energía que da lugar a transiciones electrónicas.

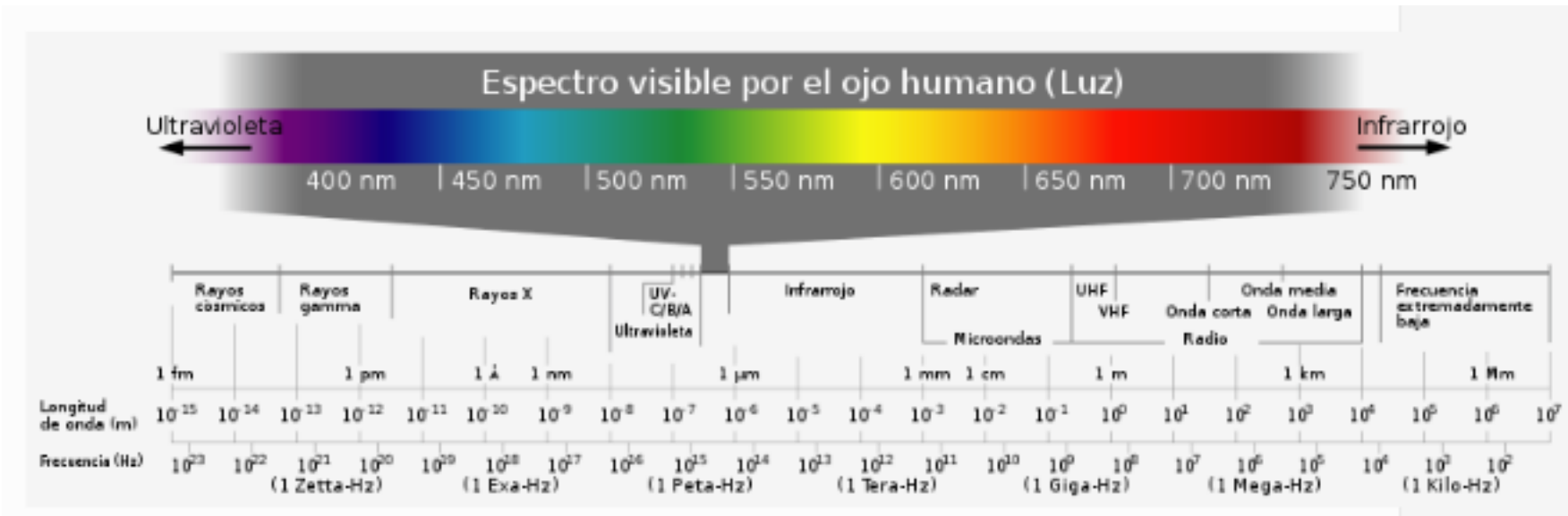


Imagen 3. Espectro visible por el ojo humano

El instrumento de medición de absorbancia detecta la cantidad de luz emitida o absorbida a través de la solución en una celda, la cual compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia denominada “blanco”.

La disminución de la intensidad de radiación depende de la concentración del absorbente y de la longitud del camino recorrido por el haz. Dichas relaciones se establecen dentro de la “Ley de Lambert-Beer”. (Aguilar M., 2018)

Ley de Lambert-Beer

Es característica de cada especie y nos dice cuánta luz absorbe a una longitud de onda determinada.

$$\left(\epsilon = \frac{A}{bc} \right)$$

A = Absorbancia (adimensional)

c = Concentración de la muestra $\left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} = M\right)$

b = Paso óptico, longitud de la celda (cm)

$\epsilon = \text{Absortividad molar o coeficiente de extinción } (M^{-1}\text{cm}^{-1})$

Limitaciones establecidas dentro de la ley.

- **Concentración del analito.**

La Ley de Lambert-Beer es restrictiva ya que únicamente describe el comportamiento de absorbancia de un analito a concentraciones bajas (<0.01 M).

- **Desviaciones químicas aparentes.**

Estas desviaciones son causa de la disociación, asociación o reacción del analito con el disolvente para originar un producto con un espectro de absorción diferente al de la especie de interés.

Estudios reportados empleando química verde



Extracción de pigmentos naturales por el método de liofilización para la elaboración de acuarelas no tóxicas.

En México se puede encontrar una gran diversidad de plantas aptas para la producción de pigmentos a bajos costos, que puedan fomentar la economía del país.

Como ejemplo encontramos el betabel, cilantro y cúrcuma. El extracto de estas plantas es utilizado como colorante alimentario. (Arciniega M., 2015).

Metodología.

La muestra vegetal se lava y pica en trozos muy finos aproximadamente 5 g de cada una, se coloca en un mortero para posteriormente agregar agua caliente y se deja reposando, después se muele por 10 minutos, se filtra y se coloca en un vaso de precipitado. Una vez hecho se le agrega 10-15 cucharadas de azúcar glass y se mezcla, ya hecho se almacena en un envase.

Para obtener el pigmento, se utiliza un liofilizador con una previa congelación de los vegetales y se introducen al instrumento. Se deben de dejar en un período de 24 horas para su deshidratación.

Resultados.

Se obtiene una variedad de pigmentos Betabel (antocianinas, betalaínas), Cúrcuma (curcúmina), Cilantro (Clorofila),

Pigmento	Cantidad del pigmento(gr)
Rojo(betabel)	20
Amarillo	20
Verde	20
Morado (Mohuite)	20

Tabla 1. Cantidad de pigmentos. (Arciniega M., 2015)

Relación del desarrollo del color con el contenido de antiocianinas y clorofila en diferentes grados de madurez de mortiño (*Vaccinium floribundum*).

Se estudio el desarrollo del color con el contenido de antiocianinas y clorofila en diferentes grados de madurez del mortiño.

En el caso de las antiocianinas poseen colores azul, violeta, magenta, rojo y naranja.

Por otro lado las clorofilas contienen un color verde característico.

El contenido de antiocianinas y de clorofilas se analizó por espectrofotometría UV-VIS. (Arteaga M., 2014)

Metodología.

Extracción y cuantificación de clorofilas y antiocianinas.

Muestra	Solvente para extracción	Análisis espectrofotómetro UV-Vs	Longitud de Onda (nm)
Clorofila	Alcohol – Agua 60%		540
Antiocianina	Alcohol – Agua 60%		645 - 662

Tabla 1. Muestras experimentales

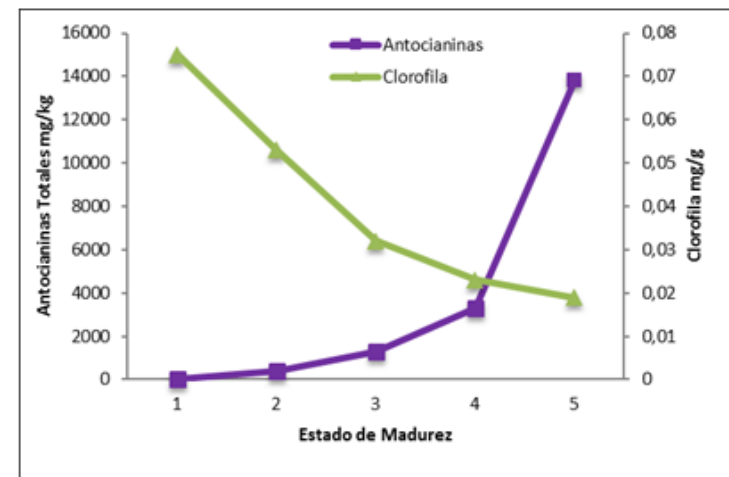
Resultados.

Estado de Madurez	Antiocianinas (mg/Kg cianidina-3-glucósido)
1	40,97 ^e
2	415,27 ^d
3	1295,9 ^c
4	3287,39 ^b
5	13830 ^a

Tabla 2. Contenido de antiocianinas en diferentes estados de madurez del mortiño (Arteaga, 2014).

Estado de Madurez	Clorofila α (mg/g)	Clorofila β (mg/g)	Clorofila Total (mg/g)
1	0,045	0,030	0,075 ^a
2	0,035	0,018	0,053 ^b
3	0,019	0,014	0,032 ^c
4	0,013	0,010	0,023 ^d
5	0,010	0,009	0,019 ^e

Tabla 2. Contenido de clorofila en diferentes estados de madurez del mortiño (Arteaga M., 2014)



Gráfica 1. Relación del contenido de clorofilas y antiocianinas por estado de madurez. (Arteaga, M., 2014)

Propuesta de aplicación analítica para el prototipo en el área de alimentos.



Práctica.

“Extracción de clorofilas y medición de contenido de magnesio en clorofilas de muestras vegetales para su análisis cualitativo a través de un prototipo espectrofotométrico elaborado con materiales sencillos”.

Justificación.

El desarrollo de prácticas experimentales en la asignatura de Química Analítica Experimental II, tienen una limitante que es el sobrecupo, la falta de instrumentos y el trabajo con reactivos que generan una gran cantidad de desechos para el desarrollo de un tema experimentalmente.

Por tal motivo se propone una práctica experimental que permita trabajar con instrumentos elaborados con materiales reciclables y desarrollar metodologías que utilicen reactivos que no generen un gran contenido de desechos basados en los principios de la química verde.

Hipótesis.

Si utilizamos el prototipo espectrofotométrico para analizar el contenido de clorofilas en muestras vegetales, obtendremos una determinación cercana si ocupados un espectrofotometro UV-Vis del laboratorio de Química Analítica Experimental II.

Objetivo.

- Proponer una práctica experimental para su análisis cualitativo en el prototipo espectrofotométrico elaborado con materiales sencillos.
- Desarrollar una metodología experimental con base en la química verde para que pueda ser propuesta y se elabore en la asignatura de Química Analítica Experimental II.

Propuesta experimental.

❖ Extracción de clorofilas en muestras vegetales conocidas para su análisis cualitativo a través del prototipo espectrofotómetro elaborado con materiales sencillos.

○ Fundamento de la técnica analítica.

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. (Abril N., 2016).

○ Aplicaciones de la técnica analítica.

Dentro de las aplicaciones que puede tener, medidas de color, determinaciones cuantitativas y cualitativas de compuestos químicos.

En la industria de los alimentos, el uso de los espectrofotómetros permiten analizar los alimentos pigmentados y cuantificarlos de acuerdo a sus concentraciones en el alimento. (Tellez C., 2019).

La clorofila, es el pigmento responsable del característico color verde de frutas y verduras, es altamente susceptible a la degradación durante el procesamiento, lo que resulta en cambios de color en los alimentos. (Bautista M., 2016).

La determinación de clorofila es importante ya que sus usos son variados desde un uso medicinal hasta alimenticio posee propiedades anticancerígenas. Antibacterianas, antioxidantes que ayudan al cuerpo humano. Así mismo, dentro de la industria es utilizado como agente de color, y sabor para alimentos. (Ruíz S., 2019).

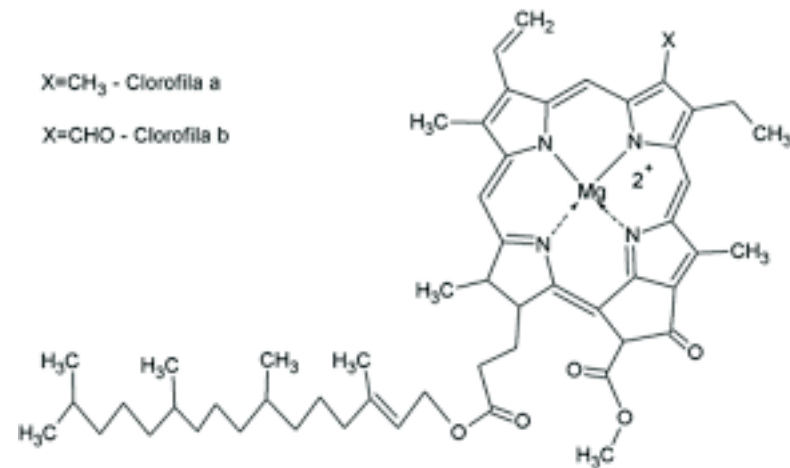


Figura 1. Estructura química de la clorofila

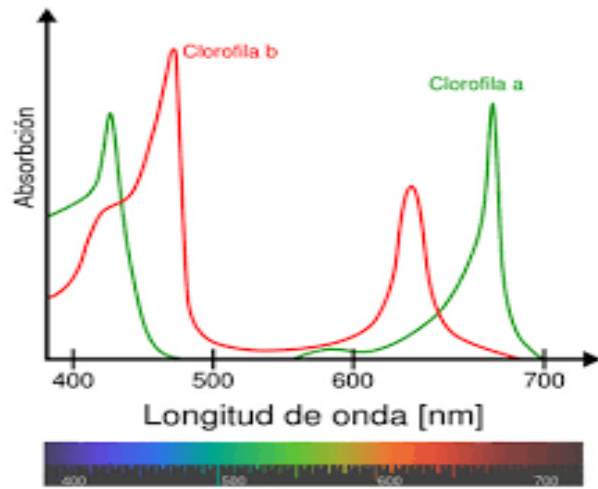


Figura 2. Espectro UV-Vis Clorofila

La clorofila es un pigmento color verde existente en las plantas, algunas algas y bacterias que permite llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. (Ruíz S., 2019).

○ Procedimiento experimental.

1. Material, equipo e instrumentos.

Prototipo espectrofotómetro UV-Vis.

Mortero con pistilo.

Vaso de precipitado.

Papel filtro.

2. Reactivos.

Muestras vegetales (Espinaca, Perejil, Albaca).

Reactivo: Alcohol/Agua 50%

3. Extracción de las clorofilas en muestras vegetales.

Pesar un aproximado de 0.5 g de muestra vegetal.

Macerar en un mortero adicionando 5 ml de solución alcohol/agua 50%.

Extraer el colorante de la muestra.

Separar el sobrenadante que contiene los pigmentos.

4. Medición en el prototipo Espectrofotómetro UV-Vis.

Tomar una alícuota de 0.5 ml del sobrenadante del extracto.

Diluir hasta 5 ml con solución alcohol/agua 50%.

Utilizar como blanco muestra solución alcohol/agua 50%.

Medir longitud de onda en el prototipo a 645-663 nm.

○ Resultados.

Concentración (ppm)	Mediciones (absorbancias)					Promedio
	1	2	3	4	5	
56000	0,073	0,075	0,076	0,074	0,076	0,075
112000	0,194	0,174	0,204	0,230	0,218	0,204
168000	0,255	0,245	0,234	0,268	0,274	0,255

Tabla 1. Espectrofotometría de clorofila extraída con alcohol de muestra de espinaca.

❖ **Medición cualitativa del contenido de magnesio en extracto de clorofila de muestras vegetales conocidas.**

Las plantas absorben magnesio de la solución del suelo como ion Mg^{2+} . Es muy móvil en la planta e importante para diferentes procesos del metabolismo de la planta.

El magnesio es un componente central de la clorofila ayuda en la síntesis, transporte y almacenamiento de compuestos vegetales como carbohidratos, proteínas y grasas. (Kassel B., 2019).

○ Procedimiento experimental.

1. Material, equipo e instrumentos.

Prototipo espectrofotómetro UV-Vis.

Mortero con pistilo.

Vaso de precipitado.

Papel filtro.

2. Reactivos.

Muestras vegetales (Espinaca, Perejil, Albaca).

Reactivo: Alcohol/Agua 50%

Cinta de magnesio.

HCl 37% v/v

Agua destilada.

3. Extracción de las clorofilas en muestras vegetales.

Pesar un aproximado de 0.5 g de muestra vegetal.

Macerarlo en un mortero adicionando 5 ml de solución alcohol/agua 50%.

Extraer el colorante de la muestra.

Separar el sobrenadante que contiene los pigmentos.

4. Curva patrón.

Medir 0.5 g de cinta de magnesio.

Mezclar con 0.5 ml de HCl al 37% v/v.

Aforar 1000 ml para obtener una concentración de 500 ppm.

Medir alícuotas de 5, 10, 15, 20 y 25 ml de la disolución y aforar a 50 ml.

Obtener concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L respectivamente.

5. Análisis del ion Mg^{2+} .

En vasos de precipitado agregar 5 ml de cada punto de la curva de calibración.

Adicionar 10 ml de la solución del reactivo natural del extracto de clorofila.

6. Medición en el prototipo Espectrofotometro UV-Vis.

Tomar las muestras de los vasos de precipitado con el extracto y la solución patrón.

Tomar una alícuota de 0.5 ml de la muestra

Diluir hasta 5 ml con solución alcohol/agua 50%.

Utilizar como blanco muestra solución alcohol/agua 50%.

Medir longitud de onda en el prototipo a 285 – 300 nm.

○ Resultados.

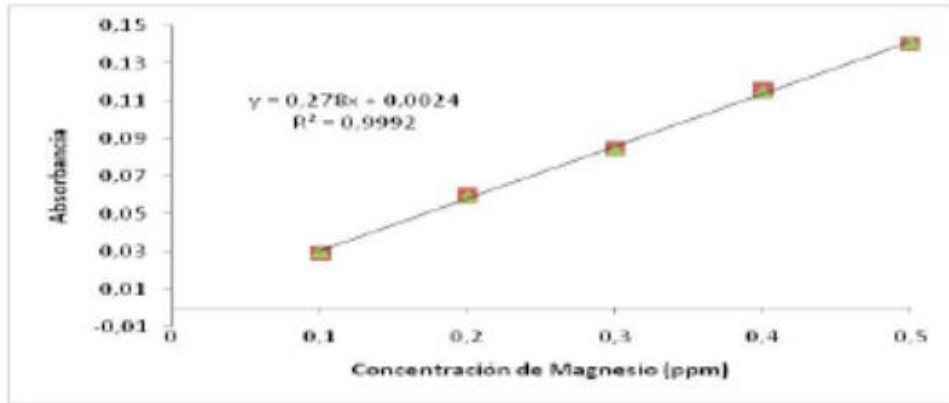


Gráfico 2. Curva de calibración para la determinación de Mg

Imagen1.

Curva de calibración para la determinación de Mg
(Betancourt C., 2017)

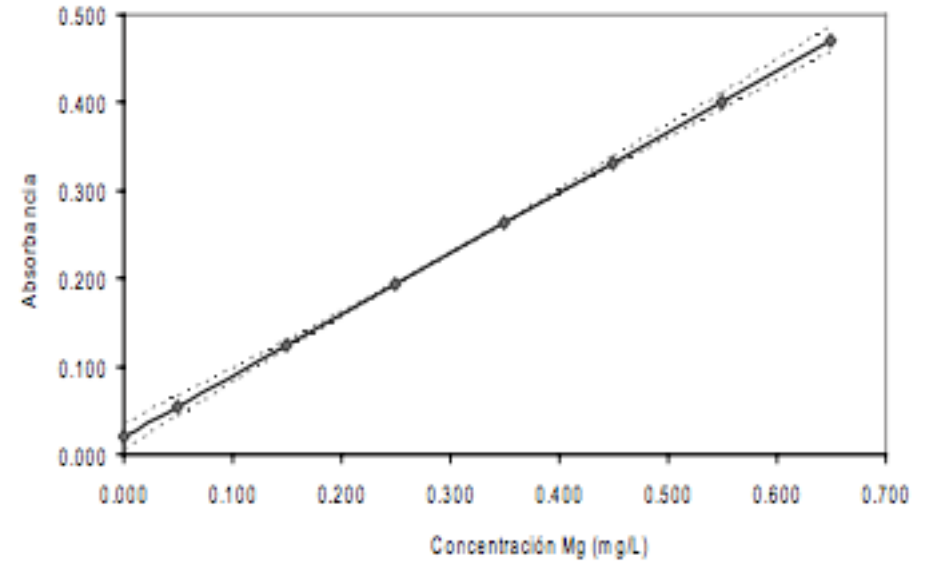


Imagen 2.

Límite de detección y límite de cuantificación para el magnesio.
(Silva P., 2010).

Fósforo	$H_2PO_4^-$	0,2	Componente de los nucleótidos y de los lípidos que forman las membranas.
Magnesio	Mg^{2+}	0,2	Forma parte de la clorofila.

Imagen 3.

Concentración de iones en tejido seco vegetal
(Margulis L., 2012)

Conclusiones

1. Investigación formativa a través de la investigación documental especializada en el tema para:

- **Estudios reportados empleando reactivos de Química Verde mediante Espectrofotometría Visible.**

Con base en los estudios encontrados y analizados, existe una gran variedad de ellos que nos permite entender cómo poder utilizar diferentes técnicas para poder buscar respuesta a un objetivo, así mismo nos permite desarrollar reactivos que puedan ser menos inofensivos para el medio ambiente ya que una de las finalidades de desarrollar una investigación con base en la química verde es encontrar soluciones al incremento de desechos tóxicos que se puedan generar basandose en alguno de los 12 principios establecidos por la Química Verde.

- **Identificar las características intrínsecas del prototipo espectrofotométrico para el análisis cualitativo y semi-cuantitativo.**

Las características principales del prototipo espectrofotométrico son que con base en la adquisición de materiales sencillos de conseguir podemos construir una herramienta que nos permita evaluar la longitud de onda de un compuesto químico, esto con la finalidad de poder obtener un valor certero sobre lo que se necesita evaluar. Es decir, este tipo de materiales nos da una apertura a tener un mejor manejo de la información ya que debido a la alta demanda que se encontramos en las asignaturas experimentales de Química Análítica, los instrumentos no llegan a ser suficientes para los alumnos, por tal motivo, es indispensable que para acceder al conocimiento y que se a homogeneo para todos los alumnos se desarrollen técnicas para poder desarrollar el conocimiento basandose en una estrategia donde lo indispensable es tener un valor de comparación con los valores reales y de esta forma tomar una decisión sobre el cumplimiento de la herramienta o desempeño comparado con el trabajo de un espectrofotómetro UV-Vis que podemos encontrar en los laboratorios.

- **Proponer aplicaciones analíticas para el protoripo en el área de alimentos.**

La propuesta de la práctica experimental para una aplicación analítica se baso en el análisis de manera cualitativa del contenido de clorofilas en muestras vegetales conocidas como lo son espinaca, perejil y alabaca. Cada una de estas materia primas muestra un contenido diferente de clorofila, dependiendo de la naturaleza de donde provenga dicho vegetal, por lo tanto, al momento de su extracción se van a tener diferentes concentraciones evaluadas a través del prototipo espectrofotométrico.

Esto nos permite tomar una decisión acerca de qué técnica voy a utilizar para poder extraer cada una de las clorofilas en muestras vegetales ya que para que se pueda extraer de manera correcta el compuesto químico se debe de tomar en cuenta un reactivo que sea capaz de solubilizar por completo dichas clorofilas pero para que sea un proceso experimental sustentable, el analito debe de cumplir con alguno de los 12 puntos de la química verde que permita no generar desechos, que pueda ser reutilizado o que su obtención sea a base de compuestos naturales.

Se tomo la decisión de utilizar un analito de alcohol/agua al 50% esto con la finalidad de que el desecho que se pueda generar sea mínimo esto debido a que la dilución del alcohol en agua permite que los compuestos volátiles del alcohol disminuyan de tal forma que al momento de preparar la solución, no se desecha de manera inmediata sino que es ocupada como sustancia reciclada a partir de una destilación simple con una concentración dada para posteriores determinaciones.

Para la segunda propuesta se analiza de manera cualitativa el contenido de magnesio en la clorofila, esto con la intención de medir su concentración ya que el magnesio es tomado directamente del suelo hacia la planta para que pueda tomar de manera correcta su contenido de compuestos vegetales como proteínas, carbohidratos y lípidos. Así mismo es aprovechada la misma solución de alcohol/agua para la extracción de la clorofila y su determinación de magnesio en ella.

Agradecimientos

Dra. Araceli Peña A. Jefa Depto. Química Analítica

Dr. Juan M. Díaz. Coordinación Química de Alimentos

PAPIME. PE205822

MI Carolina Flores A.

Dra. Minerva Monroy B.

Paola M. Herrera Chimal

Bibliografía

- Arciniega M., Gallegos S., Mendoza J. (2015). Extracción de pigmentos naturales por el método de liofilización para la elaboración de acuarelas no tóxicas, México: Universidad Iberoamericana Puebla.
- Arteaga M., Andrade M., (2014). Relación del desarrollo de color con el contenido de antocianinas y clorofilas en diferentes grados de madurez de mortiño. Enfoque UTE, Vol. 5 (No. 2). 35-45.
- Avila, J., Gavilan, I.C. y Cano. (2018). Teoría de experimentos de Química Orgánica con enfoque en Química verde, México: UNAM
- Díaz, N., Bárcena, A., Fernández, E., (2018). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas, España: Universidad de Rabanales.
- Garcia P., Pinto M., Barrios v. (2021). Obtención de clorofila a partir de cascara de sábila por medio de solventes. INGE CUC, Vol. 17 (No. 2). 133 – 142.
- Harris, C. (2007). Análisis Químico Cuantitativo, Barcelona: Reverté.

- López, Hernán, Oropeza, Ismael, & Betancourt, Catalina. (2017). Determinación de la concentración de calcio, magnesio y potasio en leche líquida de tres marcas comerciales, empleando la técnica de espectroscopia atómica. *Revista de Investigación*, 41(90), 120-133. Recuperado en 01 de mayo de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-29142017000100009&lng=es&tlng=es.
- Rodríguez L. (2016). Cultivo mixotrófico de la microalga *Coenochloris sp.* Con fracción soluble de papa para la obtención del pigmento (Carotenoides). Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Santiago, R., Velázquez, R., García, R. (2015). Extracción y Cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco, México: Universidad de Tabasco.
- Wong-Paz, Jorge Enrique, Aguilar-Zárate, Pedro, Veana, Fabiola, & Muñiz-Márquez, Diana Beatriz. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23, e20200255.