



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
28040 MADRID

Tfno: +(34)913944231

Fax: +(34)913944103

E-mail: qorgan1@quim.ucm.es

PRÁCTICAS DE QUÍMICA APLICADA A LA BIOLOGÍA

Curso 2015-2016

PRIMER CURSO
GRADO EN BIOLOGÍA

ÍNDICE

	Pág
Calificación del Laboratorio de Química	1
Normas que rigen el funcionamiento del Laboratorio de Química	2
Normas de seguridad	3
Material de Laboratorio	5
Relación de material en las taquillas	8
Relación de material adicional	9
Práctica 1: Ácidos y bases	11
Práctica 2: Oxidantes y reductores	21
Práctica 3: Cromatografía de adsorción	27
Práctica 4: Extracción	35

CALIFICACIÓN DEL LABORATORIO DE QUÍMICA

√ El laboratorio consta de 4 Sesiones de 2,5 horas de duración cada una, en las que se realizarán 4 Prácticas relacionadas con el contenido teórico de la asignatura.

√ La realización de todas las Prácticas es obligatoria. La falta de asistencia a alguna de las Sesiones de Prácticas supondrá la calificación de no apto en las Prácticas de laboratorio y consecuentemente en la asignatura. Sólo en casos justificados documentalmente, se atenderán cambios de grupo o recuperaciones de Prácticas. Para ello, el alumno debe ponerse en contacto a la mayor brevedad posible, con el Coordinador de Prácticas.

√ Durante cada una de las Sesiones de Prácticas, cada alumno, además de realizar las experiencias asignadas, deberá ir rellenando la Memoria correspondiente con los resultados obtenidos y su interpretación. Dicha Memoria será entregada a su profesor 3 días después de finalizar sus Prácticas. La no entrega de dicha memoria en el plazo establecido supondrá una calificación de suspenso en la convocatoria de febrero y la necesidad de superar un examen práctico en la convocatoria extraordinaria de septiembre.

√ El alumno obtendrá una nota en la que se incluirá tanto la labor realizada en las Sesiones como la Memoria. Esta nota, siempre que sea de al menos 4.0, constituye el 60% de la nota de Prácticas. El alumno debe obtener al menos un 4.0 en esta nota para aprobar las Prácticas.

√ Durante el examen final de la asignatura el alumno realizará, junto con la parte de Teoría, un examen escrito sobre el contenido de las Prácticas, cuya nota constituye el otro 40% de la nota de Prácticas. El alumno debe obtener al menos un 4.0 en esta nota para aprobar las Prácticas.

√ La nota de Prácticas (60% Sesiones + Memoria y 40% examen) constituirá a su vez el 15% de la calificación de la asignatura. Si el alumno suspende el examen escrito, puede repetirlo en septiembre; no así si suspende la parte práctica, por faltas de asistencia.

NORMAS QUE RIGEN EL FUNCIONAMIENTO DEL LABORATORIO DE QUÍMICA

√ *Los alumnos deberán acudir al laboratorio provistos del siguiente material:*

- Bata blanca
- Ficha cumplimentada con fotografía
- Guión de Prácticas
- Memoria de Prácticas
- Paño de algodón
- Guantes de látex/vinilo
- Rotulador de vidrio
- Candado de arco largo

√ *Los alumnos deberán leer las normas de seguridad que se recogen en las páginas 3 y 4 del Guión antes de comenzar a realizar la primera Práctica. Cada alumno firmará una hoja poniendo de manifiesto que ha sido informado sobre dichas normas.*

√ *Antes de acudir al laboratorio para comenzar una Sesión de Prácticas es preciso haber preparado la Práctica que se vaya a realizar ese día: esto incluye haber leído el Guión, comprendido el fundamento teórico de la misma y realizado los cálculos previos. No ha de iniciarse un proceso sin haber comprendido antes la finalidad de todas las operaciones. En caso de duda, pregunte siempre al profesor antes de actuar.*

√ *Todos los días, al finalizar la Sesión de Prácticas, los alumnos comprobarán que en su taquilla se encuentra todo el material que figura en el listado correspondiente, firmarán la correspondiente hoja de material.*

√ *El uso de la bata y de las gafas de seguridad es obligatorio durante toda la Sesión de Prácticas. La inobservancia de esta norma supondrá la expulsión del laboratorio, con la consecuente calificación de 0 en la práctica.*

√ *Está terminantemente prohibido fumar, comer o beber en el laboratorio.*

√ *Está prohibido verter productos químicos por los desagües. Todos los residuos generados en el desarrollo de las Prácticas se deberán depositar en los recipientes habilitados para su recuperación o eliminación.*

√ *Está prohibido terminantemente llevar a cabo cualquier experiencia distinta de las indicadas en el Guión de Prácticas, o modificar las condiciones en que se llevan a cabo, salvo expresa indicación de su profesor.*

NORMAS DE SEGURIDAD

- Ha de tenerse *orden* en la manipulación del material y en la colocación de los distintos reactivos.
- Tenga presente que *muchos reactivos son tóxicos*. Todas las operaciones en las que se desprendan gases, vapores o humos corrosivos, deben de realizarse *bajo vitrina o en su defecto al lado de una ventana*.
- Los *disolventes orgánicos* no se verterán nunca por los desagües. Se almacenarán en *unos bidones de plástico disponibles en el laboratorio*. Se diferenciará entre disolventes halogenados y no halogenados.
- *No se deben arrojar a la pila residuos sólidos* (tapones, trozos de plato poroso) que puedan obturar el desagüe, sino a la papelería. Los trozos de *vidrio* se depositarán en el *contenedor adecuado*.

MEDIDAS PREVENTIVAS Y PRECAUCIONES QUE DEBEN TOMARSE EN CASO DE ACCIDENTE

- *No deben utilizarse lentes de contacto* ya que, en caso de accidente, pueden introducirse partículas de reactivos o disolventes entre la lente y el ojo.
- Es absolutamente necesario *evitar la inhalación de vapores* de cloro, bromo, ácido nitroso y ácido nítrico, así como de los correspondientes a disolventes orgánicos.
- *No se debe pipetear con la boca* ningún compuesto orgánico ni inorgánico. Utilice siempre un aspirapipetas.
- *En caso de que un reactivo penetre en los ojos*, se acudirá rápidamente al grifo más cercano, se aclarará con agua abundante durante aproximadamente 5 minutos y se avisará al Profesor responsable.
- *Ante una quemadura producida por ácidos*, se lavará bien con agua la parte donde ha caído el ácido y luego se pondrá bicarbonato sódico sobre la piel quemada.
- Las *quemaduras con calor* se tratan aplicando pomadas para quemaduras.

PRECAUCIONES EN EL TRABAJO DE LABORATORIO

- *En el calentamiento de tubos de ensayo con reactivos*, debe de evitarse que la boca del tubo se halle dirigida hacia los compañeros inmediatos o hacia sí mismo, para evitar que una posible proyección del reactivo pueda producir lesiones o quemaduras.
- *No se olvide que el vidrio es frágil* y resulta peligroso introducir tubos de vidrio a presión, termómetros, etc. a través de orificios practicados en tapones de corcho o goma. Si hay que practicar esta operación, se protegerá la mano con un paño, para evitar cortes y se lubricarán previamente los tubos con glicerina o agua.

- *No debe emplearse agua para apagar un incendio de un líquido no miscible. Con esto sólo se contribuye a extender el fuego. Utilizar el extintor más cercano.*
- No se pueden manipular líquidos inflamables en la proximidad de mecheros encendidos.
- *Cuando sea necesario añadir H_2SO_4 concentrado a un líquido, éste debe encontrarse completamente frío y el ácido debe adicionarse muy lentamente. La adición brusca de H_2SO_4 sobre agua da lugar a proyecciones violentas con grave peligro para los ojos.*
- *No se deben introducir pipetas en las botellas o frascos generales de reactivos, para evitar riesgos de contaminación. Se introduce en un recipiente (vaso de precipitados) la cantidad aproximada que se vaya a necesitar, y se introduce en él la pipeta. De igual forma, *los reactivos sobrantes nunca se devolverán a sus recipientes originales.* Es mejor, si ha sobrado mucho, pasar dicho reactivo a otro compañero que pueda necesitarlo.*

MATERIAL DE LABORATORIO

Conservación del material

- *La calefacción se efectuará gradualmente para evitar cambios bruscos de temperatura que ocasionan su rotura.*
- *Se deberán lubricar las superficies esmeriladas, extendiendo sobre ellas una capa fina de vaselina o grasa, para evitar que se agarroten.*

Limpieza del material

- *Todo el material que se utiliza en el laboratorio debe limpiarse inmediatamente después de su uso. Para ello, se utilizará la escobilla con agua y jabón y, una vez limpio, en el caso de la columna para cromatografía, se aplicará a continuación una pequeña cantidad de acetona. *No se secará el material con papel.* Pasado algún tiempo los residuos de reactivos se adhieren a la superficie del vidrio y resulta más difícil eliminarlos. Los recipientes aforados y graduados (pipetas, probetas, etc...) deben limpiarse en frío; ¡nunca calentarse!*
- *Cualquier sólido o líquido que se derrame, tanto por la mesa como por el suelo, deberá ser limpiado inmediatamente. En caso de duda sobre el mejor método a seguir en cada caso, consultar al Profesor.*
- *Al terminar el periodo de Prácticas el material debe quedar limpio y ordenado dentro de la taquilla correspondiente, tanto el particular como el de uso general. Los reactivos quedarán ordenados (no cambiados de mesa ni abandonados junto a las balanzas).*

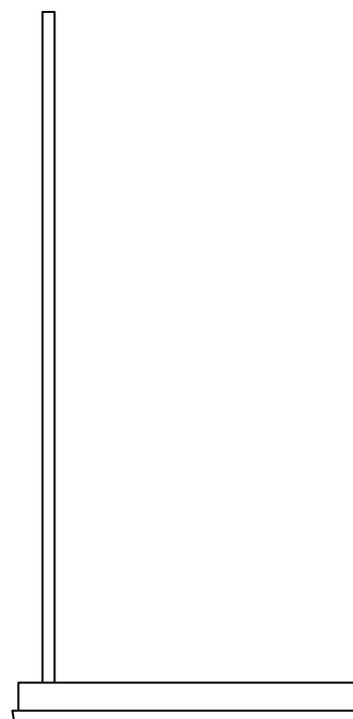
MATERIAL DE LABORATORIO

Es necesario que, antes de comenzar cualquier trabajo experimental, el alumno conozca perfectamente el material que debe utilizar. El objetivo de estas líneas es familiarizarle con el material utilizado habitualmente en un laboratorio de química, y que comience a discernir para qué tipo de operaciones se requiere cada uno de los dispositivos disponibles.

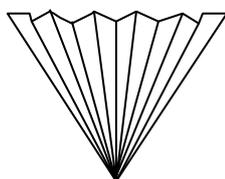
A continuación se muestra unos dibujos de algunos de los utensilios utilizados con mayor frecuencia en un laboratorio.



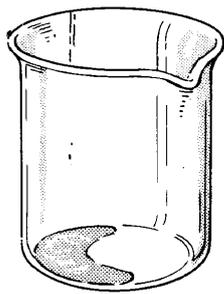
Frasco lavador



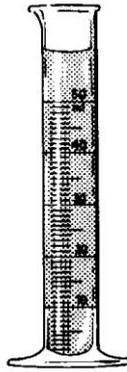
Pie o soporte



Filtro de pliegues



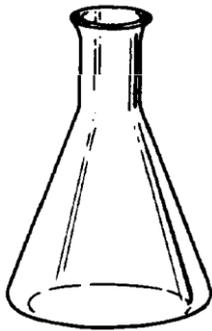
Vaso de precipitados



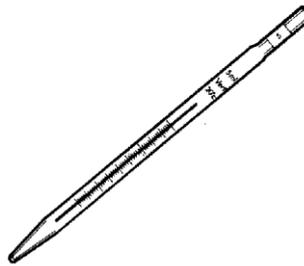
Probeta



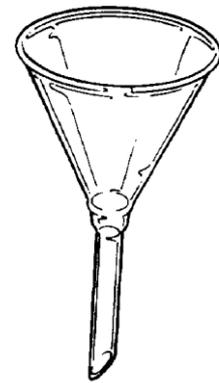
Aro con nuez



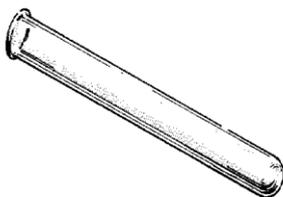
Matraz Erlenmeyer



Pipeta



Embudo cónico



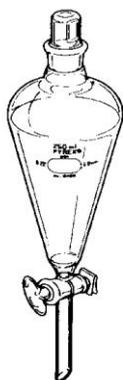
Tubo de ensayo



Vidrio de reloj



Pinza de bureta



Embudo de extracción



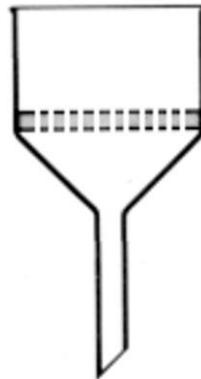
Vial



Matraz fondo redondo



Columna de cromatografía



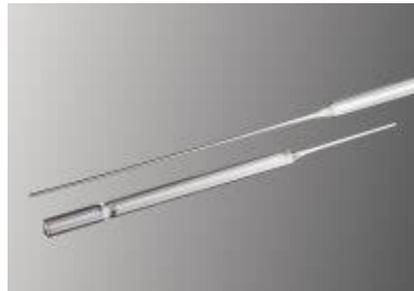
Embudo büchner



Matraz kitasato



Bureta



Pipeta Pasteur



Nuez

RELACIÓN DE MATERIAL EXISTENTE EN TAQUILLAS

A continuación se expone la relación de material existente en cada taquilla. *Al ir a utilizar la taquilla, el alumno deberá comprobar que en ella está todo el material que se relaciona y que se encuentra en buen estado.* En caso contrario lo pondrá en conocimiento del profesor para su inclusión o sustitución. Al finalizar cada Sesión de Prácticas, es necesario comprobar que la taquilla contiene todo su material (¡perfectamente limpio!).

- 1 Aro con nuez
- 1 Aro de corcho
- 1 Aspirapipetas azul (para 1 mL)
- 1 Aspirapipetas verde (para 5-10mL)
- 1 Bureta
- 1 Columna de cromatografía
- 1 Cubeta de cromatografía
- 1 Embudo cónico
- 1 Embudo de extracción con tapón
- 2 Erlenmeyer de 100 mL
- 2 Erlenmeyer de 250 mL de boca ancha
- 1 Espátula
- 2 Gafas de seguridad
- 1 Gradilla
- 1 Matraz de fondo redondo de 100 mL
- 2 Pinzas de bureta con sus nueces
- 1 Pipeta de 1 mL
- 1 Pipeta de 10 mL
- 1 Pipeta de 5 mL
- 2 Pipetas Pasteur con chupete
- 1 Probeta de 100 mL
- 10 Tubos de ensayo
- 6 Tubos de pH
- 1 Varilla de vidrio
- 1 Vaso de precipitados de 100 mL
- 1 Vaso de precipitados de 250 mL

RELACIÓN DE MATERIAL ADICIONAL

Capilares de vidrio

Cromatofolios

Cúter

Estufa

2 Granatarios

pH-metros (1 por cada 2 puestos)

Placas calefactoras (1 por cada 2 puestos)

Regla

2 Rotavapores

Soportes

Tijeras

Viales

PRÁCTICA 1: ÁCIDOS Y BASES

Objetivos

En esta Práctica se estudiará el *comportamiento ácido-base* de algunas sustancias y al mismo tiempo se utilizarán distintos métodos de medida o estimación del pH.

En el *apartado I* se estudiarán las *disoluciones reguladoras o tampón*, tanto su preparación como su capacidad amortiguadora.

En el *apartado II* se determinará la *acidez de un vinagre comercial*, estimada como concentración de ácido acético, mediante su valoración con una base fuerte.

I. EQUILIBRIOS ÁCIDO-BASE

1. Fundamento

1.1 Concepto de ácido y base

Los ácidos y las bases constituyen una clase de compuestos químicos de gran interés. El concepto de ácido y base ha evolucionado a lo largo del desarrollo de la química. Una primera definición de estos compuestos fue dada por Arrhenius:

Ácido: Toda sustancia que al disolverse en agua cede iones H^+ .

Base: Toda sustancia que al disolverse en agua cede iones OH^- .

El criterio limitaba las reacciones ácido-base a sistemas en los que el agua fuese el disolvente; además no explicaba el carácter ácido o básico de muchas sustancias que no son compuestos hidrogenados o hidroxilados. Una nueva definición de estos términos, más general y que permitía establecer una comparación entre las fuerzas de los mismos, fue dada por Brønsted y Lowry independientemente en 1923.

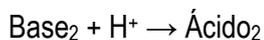
Ácido: Sustancia capaz de ceder protones.

Base: Sustancia capaz de aceptar protones.

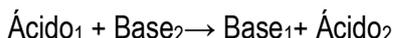
Esto se representa por la siguiente ecuación:



Los protones no pueden existir libres en disolución. La reacción sólo tiene lugar si hay otra sustancia capaz de aceptarlos:



La ecuación estequiométrica del proceso ácido-base real se obtiene combinando las dos ecuaciones anteriores:



A los sistemas $\text{Ácido}_1/\text{Base}_1$ y $\text{Ácido}_2/\text{Base}_2$ se les denomina pares ácido-base conjugados. Una reacción ácido-base es un proceso de transferencia de protones entre dos pares conjugados. Según el sistema de Brønsted-Lowry, la fortaleza de un ácido se mide por su tendencia a donar un protón, mientras que la de una base se mide por su tendencia a aceptar un protón.

Una definición más amplia fue dada por Lewis, también en 1923. Según este científico, ácido es una especie con un orbital vacante, capaz de aceptar un par de electrones, y base es una especie que puede donar un par electrónico, para formar un enlace covalente coordinado. Esta definición es más general y permite clasificar como ácidos o bases muchas sustancias que no

quedan incluidas en las anteriores definiciones. No obstante, para sistemas acuosos se emplea normalmente la definición de Brönsted-Lowry y ésta es la que se considerará en este trabajo práctico.

1.2. Concepto de pH

Una de las propiedades más importantes de una disolución acuosa es su concentración en iones hidrógeno, que se representan por H^+ o H_3O^+ . Este ion ejerce un gran efecto sobre la solubilidad de muchas especies inorgánicas y orgánicas, sobre la naturaleza de especies y complejos catiónicos presentes en una disolución, y sobre la velocidad de muchas reacciones químicas llevadas a cabo en este medio.

La concentración de ion H^+ se expresa mediante el *pH de la disolución*, que se define por la siguiente expresión:

$$pH = -\log [H^+], \text{ donde } [H^+] \text{ es la concentración del ion}$$

En disoluciones acuosas se cumple siempre la siguiente relación para el *producto iónico del agua* K_W :

$$[H^+] [OH^-] = K_W = 1.0 \cdot 10^{-14} \text{ a } 25^\circ C$$

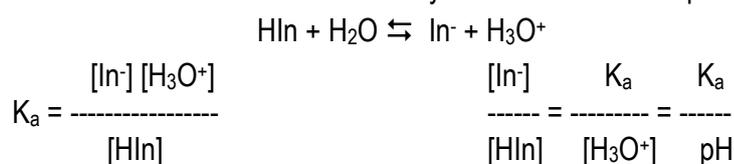
En *disoluciones neutras* $[H^+] = [OH^-]$ y, por tanto, según la ecuación anterior, su pH será igual a 7. Las disoluciones en las que $[H^+] > [OH^-]$ se llaman *disoluciones ácidas* y tendrán $pH < 7$; aquéllas en las que $[H^+] < [OH^-]$ se llaman *disoluciones básicas* y tendrán un $pH > 7$.

1.3. Medida del pH

El pH de una disolución se puede medir experimentalmente de dos modos:

a) Mediante *indicadores*. Un indicador ácido-base es, en general, un ácido débil o una base débil que presenta colores diferentes en su forma disociada y sin disociar. Este cambio de color va asociado a un cambio de estructura.

Imaginemos un indicador que sea un ácido débil, al que genéricamente representamos por HIn , y que en esta forma presenta un color al que denominamos A, mientras que en forma ionizada In^- presenta un color B. El color de la disolución que contiene al indicador dependerá de la concentración relativa entre las formas disociada y sin disociar. Para el proceso:



y por tanto la relación de concentraciones depende del pH de la disolución.

En general, el ojo humano es capaz de distinguir netamente cada uno de los dos colores cuando la concentración de una de las formas es aproximadamente 10 veces la concentración de la otra, es decir, si:

$$\frac{[In^-]}{[HIn]} \geq 10 \qquad \text{la disolución presenta color B}$$

$$\frac{[In^-]}{[HIn]} \leq 0.1 \qquad \text{la disolución presenta color A}$$

$$0.1 \leq \frac{[In^-]}{[HIn]} \leq 10$$

la disolución presenta un color intermedio entre A y B que se modifica gradualmente

El cambio neto de color del indicador se denomina viraje, y el intervalo de pH en el que se produce el cambio de color se denomina intervalo de viraje. Para un indicador dado este intervalo de viraje sería:

$$pH = pK + \log \frac{[In^-]}{[HIn]}$$

color B	$\frac{[In^-]}{[HIn]} = 10$	$pH = pK + 1$
color A	$\frac{[In^-]}{[HIn]} = 0.1$	$pH = pK - 1$

luego el intervalo de viraje corresponderá a: $pH = pK \pm 1$

b) Mediante un aparato llamado *pH-metro*. Este consta de dos electrodos que se sumergen en la disolución en estudio. El potencial de uno de ellos, electrodo indicador, depende del valor del pH del medio, mientras que el potencial del otro, electrodo de referencia, es fijo. El potencial entre los dos electrodos está relacionado, por tanto, con el pH. El pH-metro está diseñado de forma que la lectura en la escala representa directamente el pH de la disolución, para lo cual es necesario hacer un calibrado previo con una sustancia de pH conocido. Un pH-metro proporciona una medida del pH más precisa que la obtenida con un indicador.

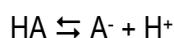


1.4. Cálculo de pH de disoluciones acuosas

1.4.1. Ácidos y bases

Ácidos y bases fuertes son aquéllos que en disolución acuosa experimentan una disociación completa. Como ejemplos típicos podemos citar el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio. Reciben el nombre de *ácidos y bases débiles* aquéllos que en disolución acuosa experimentan una disociación incompleta (excepto a dilución infinita), como por ejemplo el ácido acético.

El equilibrio de disociación de un ácido débil HA en disolución acuosa se representa:



y en el equilibrio se cumple:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad [H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

siendo K_a la constante de disociación del ácido débil.

1.4.2. Sales

La acidez o basicidad de las disoluciones de diferentes sales en agua se puede interpretar en función de su disociación completa para formar iones libres que presentan propiedades de ácido o base.

Las bases conjugadas de los ácidos débiles y los ácidos conjugados de las bases débiles reaccionan con el agua modificando el pH de ésta. En el primer caso dan carácter básico, y en el segundo carácter ácido. Esta reacción del ion con el agua recibe el nombre de hidrólisis.

Así, un anión A^- (por ejemplo, el ion acetato) procedente de un ácido débil HA (por ejemplo, el ácido acético) da la siguiente reacción con agua:



Y un catión B^+ (por ejemplo el ion amonio) procedente de una base débil (por ejemplo, el amoniaco) da la siguiente reacción con agua:



Supongamos que queremos conocer el pH resultante al disolver una sal AB, siendo A^- un ion procedente de un ácido débil HA y B^+ un ion procedente de una base fuerte. El anión A^- será por tanto una base que se hidrolizará en agua. La concentración de OH^- se calculará entonces a partir de la constante de equilibrio de basicidad K_b , que se puede a su vez relacionar con la de acidez K_a del ácido HA:



$$K_b = \frac{[HA][OH^-][H^+]}{[A^-][H^+]} \quad \frac{K_w}{K_a} = K_b$$

$$K_b = \frac{[OH^-]^2}{[A^-]} \quad [OH^-] = \sqrt{\frac{K_w}{K_a} [A^-]}$$

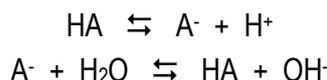
Análogamente, se obtendrían los valores de $[H^+]$ o de $[OH^-]$ para las distintas sales.

1.4.3. Disoluciones reguladoras, amortiguadoras o tampones

El pH de las disoluciones normales varía bruscamente por dilución o por ligeras adiciones de ácidos o bases. Por ejemplo, si a 1 litro de agua pura (pH 7) se le añade 1 mL de HCl 0.1 M, el pH pasa a ser 4, ya que el agua ha pasado a ser una disolución 10^{-4} M de HCl y, puesto que al ser un ácido fuerte está totalmente disociado, la concentración de H^+ es 10^{-4} M.

Sin embargo, existen determinadas disoluciones, denominadas reguladoras, amortiguadoras o tampones, que se caracterizan porque su pH apenas varía con la dilución o con pequeñas adiciones de ácido o de base. Estas disoluciones están formadas por un ácido débil y su base conjugada o por una base débil y su ácido conjugado. En la práctica se preparan mezclando un ácido o una base débil con una de sus sales totalmente disociada, como por ejemplo: ácido acético + acetato sódico, ácido bórico + borato sódico, amoniaco + cloruro amónico, etc., o añadiendo una base (o un ácido) fuerte a una disolución de un ácido (o una base) débil.

En el caso de una disolución reguladora constituida por un ácido débil HA y su base conjugada A^- , el pH se calcula del siguiente modo:



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$[\text{H}^+] = K_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

El pH depende, por tanto, de dos factores: el valor de la constante de disociación del ácido débil, K_a , y la relación de las concentraciones del par ácido-base conjugado (es decir, del ácido y de la sal). El pH puede calcularse tomando logaritmos y cambiando signos en la expresión anterior. Se obtiene:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]}$$

En esta relación (que se conoce como ecuación de Henderson-Hasselbalch) se pueden utilizar directamente las concentraciones iniciales del ácido y la sal que constituyen la disolución amortiguadora. De manera similar se obtiene el pH de una disolución reguladora constituida por una base débil y su sal.

Cuando se añaden pequeñas cantidades de un ácido o una base a la disolución amortiguadora, la relación $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ se modifica poco y el pH, por tanto, no varía prácticamente. En este caso se emplea lo que se conoce como ecuaciones de Henderson-Hasselbalch modificadas:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{base (sal)}] - [\text{ácido añadido}]}{[\text{ácido}] + [\text{ácido añadido}]}$$

y

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{base (sal)}] + [\text{base añadida}]}{[\text{ácido}] - [\text{base añadida}]}$$

Si un tampón se diluye, se modifican $[\text{A}^-]$ y $[\text{HA}]$ pero la relación entre dichas concentraciones no cambia, por lo que el pH permanece constante.

Las disoluciones amortiguadoras son más efectivas frente a cambios de pH en uno u otro sentido cuando las concentraciones de HA y A^- son aproximadamente las mismas. En estas condiciones se cumple que $\text{pH} \cong \text{p}K_a$. Por esta razón, *normalmente se selecciona como tampón aquél cuya forma ácida tiene un $\text{p}K_a$ próximo al pH deseado.*

2. Parte experimental: Preparación de una disolución reguladora y medida del pH

2.1. Material

- Aspirapipetas
- Gradilla con 6 tubos para pH-metro
- Papel indicador
- Pipeta de 1 mL graduada
- Pipeta de 5 mL graduada
- Pipeta de 10 mL graduada

- Pipeta Pasteur con chupete
- pH-metro
- Varilla de vidrio

2.2. Reactivos

- NaH_2PO_4 0.07 M
- Na_2HPO_4 0.07 M
- HCl 0.15 M
- NaOH 0.15 M
- Agua destilada

2.3. Procedimiento (Se trabajará por parejas)

Se desea preparar 10 mL de una disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ de pH 7.4.

1. Antes de comenzar la Práctica se debe calcular el volumen necesario que se debe emplear de las disoluciones de NaH_2PO_4 0.07 M y Na_2HPO_4 0.07 M. Dato: $\text{pK}_a(\text{H}_2\text{PO}_4^-) = 7.2$
2. En un vaso de precipitados se añaden con ayuda de una pipeta adecuada los volúmenes calculados de las disoluciones de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 .
3. Se preparan 6 tubos de ensayo limpios. Se añaden con una pipeta las siguientes disoluciones:
 - Tubo 1: 5.0 mL de disolución reguladora
 - Tubo 2: 5.0 mL de disolución reguladora y 0.5 mL de HCl 0.15 M
 - Tubo 3: 5.0 mL de disolución reguladora y 0.5 mL de NaOH 0.15 M
 - Tubo 4: 5.0 mL de H_2O
 - Tubo 5: 5.0 mL de H_2O y 0.5 mL de HCl 0.15 M
 - Tubo 6: 5.0 mL de H_2O y 0.5 mL de NaOH 0.15 M
4. Se mide el pH de cada una de las disoluciones anteriores mediante papel indicador.
5. Se mide el pH de cada una de las disoluciones anteriores con el pH-metro.

II. VALORACIONES ÁCIDO-BASE

1. Fundamento

1.1. Volumetría

El análisis volumétrico, llamado corrientemente *volumetría*, consiste en la determinación del volumen de una disolución de concentración conocida, que reacciona con otra disolución de la sustancia a analizar. El análisis volumétrico se puede realizar con numerosas reacciones químicas, que se pueden agrupar en varios tipos principales: reacciones de neutralización (se llama entonces acidimetría o alcalimetría), reacciones de oxidación-reducción, reacciones de precipitación y reacciones de formación de complejos.

La operación de hallar el volumen de la disolución de concentración conocida, o *disolución patrón*, necesario para completar la reacción se llama *valoración*. La concentración de la

disolución patrón debe conocerse con exactitud. Normalmente se determina por valoración con un material de referencia altamente purificado denominado patrón primario.

La finalidad de la valoración es la adición de disolución patrón en cantidad tal que sea *estequiométricamente equivalente* a la sustancia objeto de la determinación con la cual reacciona: esta condición se alcanza en el *punto de equivalencia*. El *punto final* en la valoración se determina observando *cambios físicos* asociados con el mismo.

Es necesario disponer de algún medio para conocer el punto final de la reacción volumétrica. La detección del punto final implica la observación de alguna propiedad de la disolución que cambie de manera característica. Se han empleado numerosas propiedades, como por ejemplo:

- Color, debido al reactivo o a algún indicador.
- Enturbiamiento, por la formación de una fase insoluble.
- Cambios en la conductividad eléctrica de la disolución.

1.2. Valoración ácido-base

Si se desea determinar la concentración de un ácido o una base en disolución se le hace reaccionar con una base o ácido, respectivamente, (disolución valorante) cuya concentración sea perfectamente conocida. A este proceso se le llama *valoración ácido-base*. El *punto de equivalencia* de una valoración se define teóricamente como el punto en el cual la cantidad de valorante agregado es estequiométricamente equivalente a la sustancia objeto de la determinación.

Para la siguiente reacción de valoración:



$$V_{\text{base}} \times M_{\text{base}} = \text{Número de moles de base}$$

$$V_{\text{ácido}} \times M_{\text{ácido}} = \text{Número de moles de ácido}$$

En el punto de equivalencia, de acuerdo con la estequiometría de la reacción, se cumple que:

$$\text{Número de moles de OH}^- = \text{Número de moles de H}^+$$

$$a \times \text{número de moles de base} = b \times \text{número de moles de ácido}$$

es decir $a \times V_{\text{base}} \times M_{\text{base}} = b \times V_{\text{ácido}} \times M_{\text{ácido}}$

Cuando la reacción se produce entre un ácido fuerte y una base fuerte, el pH correspondiente a la neutralización completa (punto de equivalencia) es 7. Si un ácido débil se valora con una base fuerte, el pH del punto de equivalencia es mayor que 7 (hidrólisis del anión del ácido) y cuando es una base débil la que se valora el pH es menor que 7 (hidrólisis del catión de la base).

En todo caso, en el *punto de equivalencia* se produce un *cambio brusco del pH*. Por ello, este punto puede detectarse utilizando un *pH-metro* o mediante el empleo del *indicador* adecuado.

1.3. Valoración con indicador

Los *indicadores* tienen un *carácter más débil* como ácido o como base que el ácido y la base que intervienen en la valoración, de modo que no reaccionan de forma permanente con el agente valorante ni con el agente valorado hasta que el proceso de reacción entre valorante y valorado haya concluido. Como los indicadores consumen agente valorante deben usarse en *muy pequeña cantidad*.

Para el empleo correcto de los *indicadores ácido-base* éstos deben cumplir los siguientes *requisitos*:

- Su intervalo de viraje debe contener al punto de equivalencia de forma que éste y el punto final de la valoración (aquel en el que el indicador cambia de color) coincidan lo más posible.
- Hay que usar cantidades muy pequeñas de indicador para no introducir errores por consumo de reactivos.
- El punto final de la valoración debe ser el primer cambio neto de color detectable que permanezca durante 20 ó 30 segundos.

2. Parte experimental: Determinación de la acidez total de una muestra de vinagre

2.1. Material

- Aspirapipetas
- Bureta de 25 mL graduada en décimas de mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Pinza de bureta con nuez
- Pipeta de 5 mL
- Pipeta Pasteur con chupete
- Probeta de 100 mL
- pH-metro
- Soporte

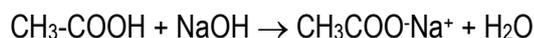
2.2. Reactivos

- Vinagre comercial
- NaOH 0.5 M
- Disolución de fenolftaleína al 1% en etanol

2.3. Procedimiento

El vinagre es una disolución que contiene diferentes tipos de ácidos (principalmente ácido acético) además de otros componentes como sulfatos, cloruros, dióxido de azufre, etc. Un índice de la calidad de un vinagre es la denominada *acidez total* (o *grado acético*) que es la *cantidad total de ácidos que contiene el vinagre expresada como gramos de ácido acético* (ácido débil, $K_a = 1.8 \times 10^{-5}$) *por 100 mL de vinagre*.

La cantidad total de ácidos puede determinarse fácilmente por *valoración con una disolución de hidróxido sódico*, calculándose la concentración en ácido acético a partir de la ecuación de la reacción ácido-base ajustada:



Teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, en el punto de equivalencia se cumplirá que:

$$n^\circ \text{ de moles de ácido} = n^\circ \text{ de moles de base,}$$

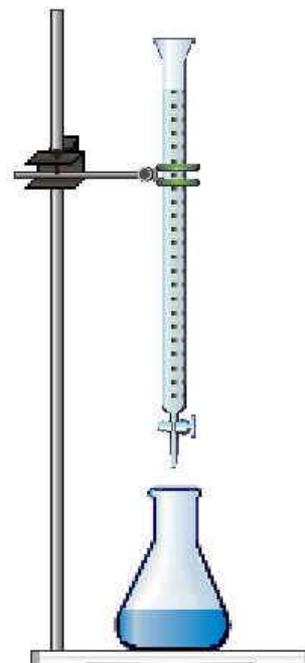
o lo que es lo mismo:

$$M_{\text{ácido}} \cdot V_{\text{ácido}} = M_{\text{base}} \cdot V_{\text{base}}$$

Conocidos tres factores de la ecuación anterior podrá calcularse el cuarto.

En el punto de equivalencia de esta valoración el pH de la disolución será básico (debido a la presencia de ion acetato) y, por tanto, para detectar el punto final de esta valoración hay que elegir un indicador que cambie de color al pH adecuado (fenolftaleína).

1. Se prepara la bureta limpiándola, homogeneizándola con una pequeña porción (5 mL) de la disolución de base (NaOH) y llenándola (sin embudo y eliminando las posibles burbujas de aire) hasta el punto de enrase con esta disolución. Asegurarse de que la llave no pierda y secar la parte exterior de la bureta.
2. Se miden exactamente 2 mL de vinagre, previamente filtrado, y se introducen en un Erlenmeyer de 250 mL.
3. Se añaden unos 100 mL de agua destilada para diluir la muestra y conseguir una disolución débilmente coloreada en la que pueda observarse con claridad el viraje del indicador.
4. Se añaden cuatro gotas de fenolftaleína (indicador).
5. Se añade, gota a gota, la disolución de NaOH desde la bureta al Erlenmeyer, agitando continua y suavemente, hasta que se produzca el viraje del indicador. En ese instante se habrá alcanzado el punto final de la valoración.
6. Se anota el volumen de NaOH utilizado, leyendo el menisco de la bureta a la altura de los ojos.
7. Se repite la valoración rellenando la bureta si es necesario y haciendo una nueva lectura inicial antes de comenzar la valoración.
8. Se calcula el número de moles de ácido presentes en la muestra valorada.
9. Se calcula la concentración inicial del vinagre utilizado.
10. Medir el pH del punto final de la valoración utilizando el pHmetro.
11. Anotar la concentración mostrada en la etiqueta de la botella de vinagre (normalmente en grados "°", que es la concentración de ácido acético expresada como % en volumen; $d_{\text{AcOH}} = 1,05 \text{ g/mL}$).



Es recomendable realizar una primera valoración rápida y una segunda más lenta, sobre todo cuando estemos próximos al punto final aproximado detectado en la primera.

PRÁCTICA 2: OXIDANTES Y REDUCTORES

Objetivos

Las disoluciones de *peróxido de hidrógeno al 3%* (peso/volumen), denominada *agua oxigenada oficial*, se emplean para la desinfección. Este fuerte oxidante tiene un amplio espectro germicida ya que es eficaz frente a bacterias, hongos e incluso al virus del SIDA y formas resistentes como esporas y quistes; además esta desinfección se realiza en un período de tiempo corto.

El hierro es uno de los nutrientes vegetales que más problemas presenta en cuanto a la nutrición de los cultivos. Esto se debe en gran medida a que, en sistemas aireados en el rango de los pH fisiológicos, la concentración de iones Fe^{3+} y Fe^{2+} es inferior a 10^{-15} M, insuficiente para cubrir las necesidades de los vegetales. Por lo tanto, en los suelos y disoluciones nutritivas son los quelatos de Fe(III) y ocasionalmente los de hierro(II) las formas predominantes de hierro soluble. Por regla general, los vegetales prefieren coger el Fe(II) al Fe(III), aunque esto depende de las especies.

En esta Práctica se va a determinar en primer lugar la *concentración de un agua oxigenada comercial*, y en segundo lugar la de una disolución problema de Fe(II), utilizando en ambos casos una disolución de permanganato de potasio de concentración conocida, (estas valoraciones reciben el nombre de *permanganimetrías*).

1. Fundamento

1.1. Volumetrías

El análisis volumétrico, llamado corrientemente *volumetría*, consiste en la determinación del volumen de una disolución conocida, que reacciona con otra disolución de la sustancia a analizar. El análisis volumétrico se puede realizar con numerosas reacciones químicas, que se pueden agrupar en varios tipos principales: reacciones de neutralización (se llama entonces acidimetría o alcalimetría), reacciones de oxidación-reducción, reacciones de precipitación y reacciones de formación de complejos.

La operación de hallar el volumen de la disolución de concentración conocida, o *disolución patrón*, necesario para completar la reacción se llama *valoración*. La concentración de la disolución patrón se determina por valoración con un material de referencia altamente purificado: patrón primario.

La finalidad de la valoración es la adición de disolución patrón en cantidad tal que sea *estequiométricamente equivalente* a la sustancia objeto de la determinación con la cual reacciona: esta condición se alcanza en el *punto de equivalencia*. El *punto final* en la valoración se determina observando *cambios físicos* asociados con él mismo.

Es necesario disponer de algún medio para conocer el punto final de la reacción volumétrica. La detección del punto final implica la observación de alguna propiedad de la disolución que cambie de manera característica. Se han empleado numerosas propiedades, como por ejemplo:

- Color, debido al reactivo o a algún indicador.
- Enturbiamiento, por la formación de una fase insoluble.
- Cambios en la conductividad eléctrica de la disolución.

1.2. Peróxido de hidrógeno

El *agua oxigenada comercial* es una disolución de agua oxigenada (H_2O_2) en agua destilada con una concentración variable: *del 3 al 30%* (3 a 30 g H_2O_2 / 100 mL de disolución). En la vida cotidiana, esta concentración se suele indicar en “*volúmenes*”, expresión que nos indica el *volumen de oxígeno* que puede desprender un volumen determinado de la disolución. Así, si un agua oxigenada es de 10 volúmenes quiere decir que 1 litro de esa disolución tiene una cantidad de agua oxigenada tal que es capaz de desprender 10 litros de oxígeno, medidos en condiciones normales, cuando se produce su *descomposición* según la reacción:



donde 2 moles de agua oxigenada (34 gramos / mol) desprenden 1 mol de oxígeno gaseoso, el cual en condiciones normales ocupa 22,4 litros. Es decir, que 1 volumen equivale a 1 litro de oxígeno, o lo que es lo mismo, a 1 / 22,4 moles, y, por tanto a 2 / 22,4 moles de agua oxigenada.

Las disoluciones de agua oxigenada se descomponen lentamente según la reacción anterior. Su contaminación con metales, polvo u otras sustancias acelera su descomposición, que en el caso de concentraciones altas puede ser violenta con generación rápida de grandes cantidades de oxígeno y altas presiones. Con objeto de reducir este proceso de descomposición, estas disoluciones *deben mantenerse protegidas de la luz y en lugar frío*.

El agua oxigenada es un oxidante fuerte y puede causar heridas en las mucosas o en los ojos por lo que no debe producirse su contacto. Utilice las gafas de seguridad.

1.3. Permanganato de potasio

Las *permanganimetrías* son un tipo de volumetrías que utilizan disoluciones de permanganato de potasio (KMnO_4) de concentración conocida para valorar disoluciones de otras sustancias que reaccionen con él. El KMnO_4 es un *oxidante fuerte* que tiene una gran aplicación en *valoraciones redox* y que presenta las siguientes *ventajas*:

- es autoindicador, es decir su color violeta intenso no necesita de otros indicadores para observar el punto de equivalencia;
- es un reactivo de bajo costo;
- reacciona rápidamente con muchas sustancias reductoras.

Por contra, estas valoraciones deben realizarse todas ellas en *medio ácido*, generalmente ácido sulfúrico, para evitar la formación del dióxido de manganeso, que es un sólido de color pardo cuya formación impide observar el punto final de la valoración.

El permanganato de potasio es un oxidante fuerte y puede causar heridas en las mucosas o en los ojos, por lo que no debe producirse su contacto. Utilice las gafas de seguridad.

1.4. Sal de Mohr

La llamada **sal de Mohr** es el sulfato ferroso amónico o sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado, es decir, es una sal doble. Su nombre rinde homenaje al químico alemán Karl Friedrich Mohr, ya que realizó importantes avances en el campo de las valoraciones químicas. Es un compuesto muy estable frente al oxígeno atmosférico y cristaliza en el sistema monoclinico en forma hexahidratada.

El producto sólido puede ser irritante para la piel, los ojos o las vías respiratorias, pero en disolución no presenta ningún tipo de peligrosidad.

Entre sus usos más habituales se encuentran la preparación de patrones para medidas de ferromagnetismo o su empleo en análisis de suelos y agua en agricultura, para valorar la materia orgánica presente o la demanda química de oxígeno. También se ha empleado como abono para tratar el problema de la clorosis férrica de los cítricos.

2. Parte experimental

2.1. Determinación de la concentración de un agua oxigenada comercial

2.1.1 Material

- Aspirapipetas
- Bureta de 25 mL graduada en décimas de mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Pinza de bureta con nuez
- Pipeta de 5 mL
- Pipeta Pasteur con chupete
- Probeta de 100 mL
- Soporte

2.1.2. Reactivos

- H₂O₂ comercial
- KMnO₄ 0.02 M
- H₂SO₄ 1 M

2.1.3. Procedimiento

En esta parte de la Práctica se va a realizar una *permanganimetría para determinar la concentración de un agua oxigenada comercial mediante su valoración con una disolución de permanganato de potasio de concentración conocida*. En disolución ácida el permanganato (MnO₄⁻) violeta oxida el H₂O₂ a O₂, reduciéndose a Mn²⁺ (incoloro) según la ecuación siguiente (sin ajustar):



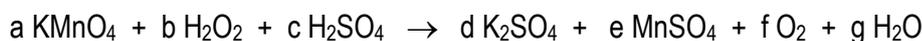
Cuando se añade gota a gota una disolución de KMnO₄ sobre una disolución ácida de H₂O₂, cada gota reacciona con el agua oxigenada y se decolora mientras quede H₂O₂ en la disolución. Cuando se añade una gota y se haya gastado todo el agua oxigenada, el exceso de KMnO₄ coloreará la disolución indicando que hemos llegado al *punto de equivalencia*.

En el punto de equivalencia se cumple que:

$$\text{milimoles de permanganato} = V_{\text{permanganato}} (\text{en mL}) \times M_{\text{permanganato}}$$

$$\text{milimoles de H}_2\text{O}_2 = V_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{en mL}) \times M_{\text{H}_2\text{O}_2}$$

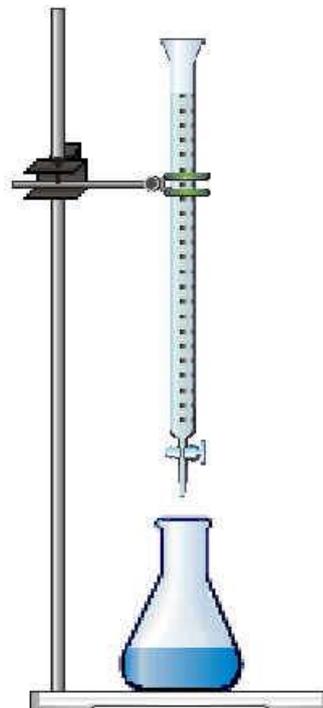
En las reacciones redox el número de electrones liberados por el reductor debe ser igual al aceptado por el oxidante, lo que se refleja en los coeficientes de la reacción ajustada, por tanto, en el punto de equivalencia se cumple que:



milimoles de H_2O_2 x a = milimoles de permanganato x b

Por tanto, conociendo la concentración de la disolución de KMnO_4 , el volumen adicionado y el volumen inicial de la disolución de H_2O_2 se puede calcular su concentración en peso-volumen, molaridad, etc.

1. Se prepara la bureta limpiándola, homogeneizándola con una pequeña porción (5 mL) de la disolución de KMnO_4 y llenándola (sin embudo y eliminando las posibles burbujas de aire) hasta el punto de enrase con esta disolución. Asegurarse de que la llave no pierda y secar la parte exterior de la bureta.
2. En un Erlenmeyer de 250 mL se añaden 1.0 mL de la disolución de agua oxigenada comercial y a continuación 50 mL de ácido sulfúrico 1 M. Se agita para mezclar la disolución.
3. Se añade la disolución de KMnO_4 gota a gota sobre la disolución de H_2O_2 agitando continuamente el Erlenmeyer después de cada adición hasta observar la aparición de un color violáceo persistente, momento en el cual se habrá terminado la valoración.
4. Se anota el volumen de KMnO_4 consumido, leyendo el menisco con la bureta a la altura de los ojos.
5. Se repite la valoración rellenando la bureta si es necesario y haciendo una nueva lectura inicial antes de comenzar la valoración.



Es recomendable realizar una primera valoración rápida y una segunda más lenta, sobre todo cuando estemos próximos al punto final aproximado detectado en la primera.

2.2. Determinación de la concentración de una disolución problema de Fe(II)

2.2.1 Material

- Aspirapipetas
- Bureta de 25 mL graduada en décimas de mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Pinza de bureta con nuez
- Pipeta de 5 mL
- Pipeta Pasteur con chupete
- Probeta de 100 mL
- Soporte

2.2.2. Reactivos

- Disolución problema de Fe(II)
- KMnO_4 0.02 M
- H_2SO_4 1 M

2.2.3. Procedimiento

En esta parte de la Práctica la *permanganimetría* se va a emplear para determinar la concentración de una disolución de Fe(II) mediante su valoración con una disolución de permanganato de potasio de concentración conocida. En disolución ácida el permanganato (MnO_4^-) violeta oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} , reduciéndose a Mn^{2+} (incolore) según la ecuación siguiente (sin ajustar):



Cuando se añade gota a gota una disolución de KMnO_4 sobre una disolución ácida de FeSO_4 , cada gota reacciona con el Fe^{2+} y se decolora mientras quede sulfato ferroso en la disolución. Cuando se añada una gota y se haya gastado todo el sulfato ferroso, el *exceso de KMnO_4 coloreará la disolución* indicando que hemos llegado al *punto de equivalencia*.

En el punto de equivalencia se cumple que:

$$\text{milimoles de permanganato} = V_{\text{permanganato}} (\text{en mL}) \times M_{\text{permanganato}}$$

$$\text{milimoles de Fe(II)} = V_{\text{Fe(II)}} (\text{en mL}) \times M_{\text{Fe(II)}}$$

En las reacciones redox el número de electrones liberados por el reductor debe ser igual al aceptado por el oxidante, lo que se refleja en los coeficientes de la reacción ajustada, por tanto, en el punto de equivalencia se cumple que:



$$\text{milimoles de FeSO}_4 \times a = \text{milimoles de permanganato} \times b$$

Por tanto, conociendo la concentración de la disolución de KMnO_4 , el volumen adicionado y el volumen inicial de la disolución de Fe(II) se puede calcular su concentración en peso-volumen, molaridad, etc.

1. Se rellena la bureta con la misma disolución de permanganato potásico empleada en la parte anterior.
2. En un Erlenmeyer de 250 mL se añaden 5.0 mL de la disolución problema de Fe(II) y a continuación 50 mL de ácido sulfúrico 1 M. Se agita para mezclar la disolución.
3. Se añade la disolución de KMnO_4 gota a gota sobre la disolución de Fe(II) agitando continuamente el Erlenmeyer después de cada adición hasta observar la aparición de un color violáceo persistente, momento en el cual se habrá terminado la valoración.
4. Se anota el volumen de KMnO_4 consumido, leyendo el menisco con la bureta a la altura de los ojos.
5. Se repite la valoración rellenando la bureta si es necesario y haciendo una nueva lectura inicial antes de comenzar la valoración.

Al finalizar la Práctica se debe limpiar la bureta sin desmontarla con una disolución de agua oxigenada y posteriormente aclararla varias veces con agua.

PRÁCTICA 3: CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

Objetivos

En esta Práctica se ensayará la utilización de dos técnicas cromatográficas básicas, denominadas *cromatografía en columna* y *cromatografía en capa fina*.

En el apartado I se procederá a separar los pigmentos responsables del color de las hojas de espinaca empleando una *cromatografía en columna*. En primer lugar se extraerán los pigmentos de la planta utilizando una mezcla de disolventes orgánicos. El extracto orgánico contiene principalmente dos moléculas: *caroteno*, un pigmento amarillo especialmente abundante en las espinacas y *clorofila*, un complejo metálico de magnesio con un gran ligando orgánico de color verde-azulado o amarillo-verdoso, que funciona como catalizador en la fotosíntesis. Estos compuestos se pueden aislar prácticamente puros haciendo pasar la mezcla por una columna de gel de sílice al final de la cual se recogen en fracciones separadas. Este experimento es prácticamente equivalente al realizado por el botánico ruso Tswett (1872-1919) al que se atribuye el descubrimiento de la *cromatografía* cuando observó que el color verde de las hojas se debía a la presencia de varios componentes coloreados.

En el apartado II se procederá a identificar una mezcla desconocida de aminoácidos por comparación con varios aminoácidos patrón conocidos.

1. Fundamento

La *cromatografía de adsorción* es una técnica muy empleada en la separación de mezclas de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, que la mayoría de las veces sólo se pueden separar por otros procedimientos muy difícilmente. Se emplea, sobre todo, cuando se trata de sustancias de propiedades físicas y químicas muy semejantes. Por todo esto es importante que el alumno conozca el fundamento de dicha técnica.

Esta técnica está basada en las *diferencias de polaridad* existentes entre los diferentes productos que componen una mezcla. Por esta razón, el éxito de una separación cromatográfica dependerá de las condiciones de separación elegidas para diferenciar adecuadamente los componentes de la mezcla a separar en función de su polaridad.

Aunque hay diferentes tipos de *cromatografía* en función del procedimiento operativo empleado: *en columna*, *de papel*, *de cambio de iones*, *en fase gaseosa* y *en capa fina*, los fundamentos son idénticos en todos los casos, lográndose la separación de las mezclas por exposición de las mismas a un *sistema bifásico que se deja llegar al equilibrio*. Las dos fases que intervienen en la separación pueden ser dos líquidos inmiscibles (*cromatografía líquido-líquido*), un gas y una fase líquida (*cromatografía gas-líquido*), un gas y una fase sólida (*cromatografía gas-sólido*) o un líquido y una fase sólida (*cromatografía líquido-sólido*).

Normalmente, una de las fases del sistema binario es estacionaria con respecto a la otra. Por ello suele hablarse casi siempre de una *fase estacionaria* y una *fase móvil*. Aunque a veces no es sencillo establecer el papel de cada fase, puede decirse que la *cromatografía líquido-líquido* corresponde, aproximadamente, a *múltiples extracciones* (véase Práctica 4), mientras que las *cromatografías gas-sólido* y *líquido-sólido* se basan en la *adsorción* de la muestra en una superficie. Las *cromatografías en columna* y *capa fina* (CCF) son, en esencia, similares y utilizan la *adsorción* como medio principal de separación.

En cualquiera de los tipos de cromatografía (columna o capa fina) hay que tener en cuenta tres factores: *adsorbentes, eluyentes y aparatos*.

A. Adsorbentes

Un *adsorbente (fase estacionaria)* para una separación determinada debe reunir las siguientes características:

- Debe ser insoluble en el eluyente que se va a utilizar para la separación.
- No debe reaccionar con las sustancias que se van a separar, ni catalizar procesos de descomposición.
- Debe poseer una composición uniforme.
- Cuanto menor sea el tamaño de las partículas, mayor será el grado de separación de la mezcla.

Los tipos de adsorbentes más utilizados son: gel de sílice, alúmina, talco, sacarosa, almidón.

B. Eluyentes

El poder de adsorción depende tanto de la naturaleza del adsorbente como del *eluyente*. Normalmente este último está constituido por *mezclas de disolventes de composición variable y de distinta polaridad*. Las características que debe reunir un buen eluyente son las siguientes:

- Debe disolver a los componentes de la mezcla a separar.
- No debe reaccionar con ellos.
- No debe disolver al adsorbente.
- Debe tener un punto de ebullición relativamente bajo para poder eliminarse posteriormente con facilidad.

C. Aparatos

Dependiendo de la cromatografía que se lleva a cabo, pueden utilizarse diversas variantes:

- *Columna*: es un tubo de vidrio largo terminado en su parte inferior en un tubo más estrecho con una llave esmerilada.
- *Capa fina*: consiste en una placa de vidrio (o una hoja de aluminio) que se recubre con el adsorbente.

Por otra parte en cualquier tipo de cromatografía debe tenerse en cuenta la *capacidad de adsorción de los compuestos orgánicos*, que está determinada, en primer lugar, por la *naturaleza y número de los grupos polares* existentes en sus moléculas. La fase móvil o eluyente disolverá y desplazará estos componentes de acuerdo con la afinidad de los mismos por la superficie sólida y su solubilidad. Una conclusión inmediata es que cuanto mayor sea la superficie del adsorbente (menor tamaño de partícula, a igualdad de otros factores, supone una mayor relación adsorbente/producto a separar) tanto mejor será la separación. Sin embargo, un aumento de la cantidad de adsorbente o una disminución de tamaño de grano suponen mayores tiempos de separación y un gasto superior de eluyente. Normalmente se suele llegar a un compromiso entre ambos factores.

La efectividad de una fase móvil para eluir (desplazar) un componente a lo largo de la fase estacionaria depende de numerosos factores tales como el adsorbente, el tipo de compuestos que se pretende separar, el disolvente empleado como eluyente y, en menor medida, la temperatura y

la velocidad de flujo. Para un mismo adsorbente, la polaridad de la muestra y el eluyente son los factores determinantes.

Cuanto más polar sea un compuesto, tanto más firmemente se unirá al adsorbente. Por otra parte, cuanto más polar sea la fase sólida, más fuertemente se adsorberá un compuesto en ella. Finalmente, cuanto mayor sea la polaridad del disolvente, mayor será su capacidad para desplazar un compuesto de la fase estacionaria. El efecto resultante, en una *cromatografía*, es una *competencia por el compuesto entre la fase móvil y el adsorbente*. Debe esperarse que una mezcla permanezca más tiempo en aquella superficie o aquel medio que se parezca más a su polaridad. El orden en el que se eluirán los compuestos de la gel de sílice o de la alúmina es el inverso a su capacidad de unión con dicho adsorbente.

Sin embargo es bastante difícil establecer una relación de las capacidades de adsorción de las distintas clases de *compuestos orgánicos*, que sea aplicable a todos los tipos de adsorbentes y disolventes, aunque sí puede establecerse una relación aproximada que por *orden decreciente de capacidad de adsorción*, pueden clasificarse en:

Ácidos carboxílicos > Aminas > Alcoholes y tioles > Aldehídos, cetonas y ésteres > Hidrocarburos aromáticos > Derivados halogenados > Éteres > Alquenos > Alcanos.

A su vez, el *poder eluyente de los disolventes* más habituales sigue el siguiente *orden descendente*:

Acido acético > Agua > Metanol > Etanol > Acetona > Acetato de etilo > Dietiléter > Diclorometano > Cloroformo > Tolueno > Tetracloruro de carbono > Hexano > Pentano.

1.1. Cromatografía en capa fina

Esta técnica tiene un *interés analítico* principalmente, aunque también se emplea con fines preparativos. En la base de la placa se coloca, con un capilar, la mezcla a separar disuelta en un disolvente que se evapora con rapidez, y después se introduce verticalmente en una cubeta que contiene el eluyente sin que éste llegue a los puntos de aplicación del problema. Se cierra la cubeta y el *eluyente asciende por capilaridad sobre el adsorbente, arrastrando a las sustancias de la mezcla en mayor o menor medida según la fuerza con que están unidas al adsorbente*, realizándose así la separación de las mismas.

Cuanto más polar es el eluyente, mayor es la tendencia a arrastrar las sustancias de la mezcla.

Una magnitud de interés en cromatografía es la que se conoce como *factor de retención R_f* , que se define:

$$R_f = \frac{X}{Y}$$

X = distancia desde el punto de aplicación hasta la posición final de la sustancia.

Y = distancia desde el punto de aplicación hasta la altura máxima alcanzada por el disolvente.

Cada uno de los componentes de la mezcla tiene su valor de R_f característico, que en muchas ocasiones permite *identificarlo por comparación con una muestra patrón*. Si la sustancia no es coloreada, su localización en la placa se hace mediante el empleo de luz UV o de reveladores químicos.

Las aplicaciones más características de la *cromatografía en capa fina* son las siguientes:

- *Determinación del número de componentes de una muestra.*
- *Determinación de la identidad de dos sustancias.* Para ello es fundamental calcular los R_f de cada una de las manchas que se observan en una cromatografía en capa fina. Cada mancha corresponde a un producto diferente. Si dos compuestos dan manchas idénticas (con el mismo R_f) en una misma placa cromatográfica, es probable que se trate de la misma sustancia. Si los R_f no son iguales, las sustancias no son idénticas. Valores idénticos o muy próximos de R_f no garantizan inequívocamente que las manchas correspondientes sean del mismo compuesto.
 - *Seguimiento de la evolución de una reacción.* Desarrollando cromatogramas de una reacción cada cierto tiempo, es posible seguir la desaparición de los reactivos y la aparición de los productos. Se puede, entonces, determinar el tiempo de reacción óptimo y el efecto de diversas variables sobre la reacción (tiempo, temperatura, concentración de reactivos, etc.) sin necesidad de aislar los productos.
 - *Determinación de la eficacia de una purificación.* Un cromatograma de una sustancia que se ha purificado sirve para determinar cualitativamente su pureza. No siempre la aparición de una sola mancha en el cromatograma garantiza inequívocamente la pureza del compuesto, ya que puede ocurrir que dos o más compuestos diferentes presenten el mismo valor de R_f y, por tanto, den una única mancha.
 - *Determinación de las condiciones más adecuadas para una cromatografía en columna.* Una Práctica habitual antes de hacer una cromatografía en columna es realizar varias CCF con diferentes adsorbentes y eluyentes. De esta forma se puede determinar, de una forma sencilla y rápida, cuáles son las condiciones óptimas para llevar a cabo la separación de una mezcla de productos mediante una cromatografía en columna.
 - *Seguimiento del progreso de una cromatografía en columna.* Uno de los métodos que más se emplean para seguir la evolución y la eficacia de una cromatografía en columna consiste en ir analizando las diferentes fracciones obtenidas mediante CCF. Esto permite saber cuándo ha terminado la separación y el grado de pureza que tienen los productos disueltos en cada fracción.

1.2. Cromatografía en columna

La *cromatografía en columna* se emplea para *separar y purificar mezclas de productos a escala preparativa*. En la cromatografía en columna el adsorbente se introduce en un tubo o columna, por lo general de vidrio y la fase móvil o eluyente (usualmente un disolvente orgánico) se deja caer a través de la columna por gravedad (cromatografía atmosférica) o bien aplicando presión (cromatografía rápida o *flash*).

2.1. Parte experimental: CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: Separación de los pigmentos de las hojas de espinaca

2.1.1. Material

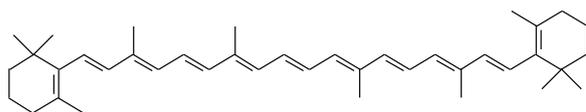
- Algodón
- Columna de vidrio con llave
- Erlenmeyer de 100 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Gradilla con 12 tubos de ensayo
- 2 Pinzas con sus nueces
- Pipeta de 5 mL
- Pipeta Pasteur con chupete
- Probeta de 100 mL
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Vaso de precipitados de 250 mL

2.1.2. Reactivos

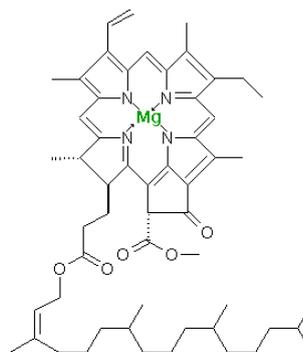
- Gel de sílice
- Hojas de espinaca
- Arena de mar
- Hexano
- Acetona

2.1.3. Procedimiento

La separación del β -caroteno y la clorofila de las hojas de la espinaca involucra un procedimiento de elución de dos etapas. Primero se eluye el extracto con hexano y después con acetona. Si examinamos las estructuras moleculares de estos compuestos podremos razonar por qué es efectiva esta separación. El β -caroteno es un hidrocarburo, ya que sólo contiene carbono e hidrógeno, mientras que la clorofila contiene átomos de oxígeno, nitrógeno y un átomo metálico, además de carbono e hidrógeno. Las diferencias en la polaridad de ambos compuestos es tan grande que cuando el hexano, que es apolar, se emplee como eluyente, el pigmento apolar (β -caroteno) se eluye rápidamente mientras que el pigmento polar (clorofila) se retiene en la parte superior de la columna. Para eluir la clorofila debe entonces emplearse, a continuación, acetona que es un eluyente más polar.



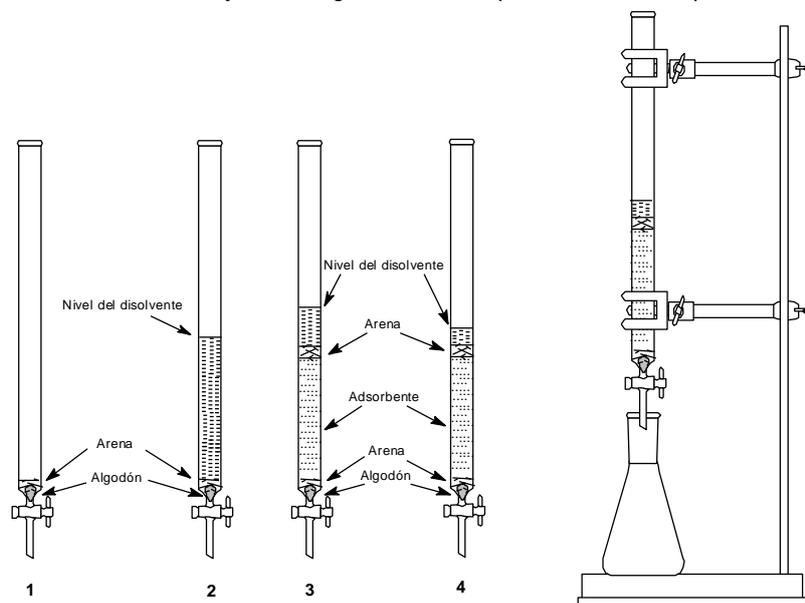
Caroteno



Clorofila

Preparación del extracto: (por parejas) Se pesan 10 g de hojas de espinacas en un vaso de precipitados de 100 mL, cortadas en pequeños trozos. Se añaden 15 mL de una disolución de hexano y acetona 8:2 y se trituran concienzudamente durante unos minutos con ayuda de la espátula. Se filtra el extracto en filtro de pliegues a un Erlenmeyer de 100 mL.

1. En una columna se introduce un trocito de algodón en la parte estrecha del tubo.
2. Se aprieta con cuidado de no taponar totalmente la entrada a la llave y a continuación se añade 1 cm de arena de mar y un poco de hexano (eluyente que se va a utilizar).
3. Se prepara una papilla con 6 g de gel de sílice (adsorbente) y 30 mL hexano.
4. Se comienza a llenar la columna con la papilla. Se golpea suavemente la columna para evitar que se formen burbujas o canales de aire en el adsorbente y conseguir que la superficie del mismo adopte una disposición horizontal.
5. Cuando se ha depositado toda la gel de sílice, se añade de nuevo 1 cm de arena de mar para proteger el frente del adsorbente y se lavan las paredes de la columna con pequeñas cantidades de eluyente para eliminar los restos de adsorbente y arena adheridos.
6. Se deja que el nivel del eluyente (hexano) descienda hasta aproximadamente medio centímetro sobre el frente del adsorbente.
7. Se toman con una pipeta 5 mL del extracto de pigmentos (disolución de hexano/acetona) descartando la fase inferior acuosa. Se adicionan a la columna cuidadosamente con una pipeta Pasteur, mediante un movimiento rotatorio que distribuya uniformemente la mezcla sobre la superficie del adsorbente, sin deformarla. A continuación se abre la llave de la columna y se deja que la mezcla se adsorba.
8. Se cierra la llave, se añade una pequeña cantidad de hexano y se deja que se adsorba, sin permitir en ningún momento que la columna se seque (es decir, que el nivel del eluyente alcance la superficie del adsorbente). Este proceso se repite dos veces, y a continuación se llena la columna hasta su mitad con hexano (cuidando de no deformar el frente) y se comienza el desarrollo del cromatograma.
9. Se recogen fracciones en tubos de ensayo hasta que se haya eluido todo el β -caroteno (disolución anaranjada). Hay que tener cuidado de que la columna no se seque y tenga siempre disolvente, ya que en caso contrario la separación deja de ser efectiva.
10. Se añade acetona a la columna y se recoge la clorofila (disolución verde).



2.II. Parte experimental: CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA: Identificación de una mezcla desconocida de aminoácidos

2.II.1. Material

- Capilar de vidrio
- Cubeta de cromatografía
- Placa de cromatografía
- Regla
- Tijeras

2.II.2. Reactivos

- Problema de aminoácidos
- Testigos de aminoácidos
- Mezcla CHCl_3 / CH_3OH / NH_4OH
- Ninhidrina etanólica al 0.2%

2.II.3. Procedimiento

Se procede a *identificar una mezcla desconocida de aminoácidos por comparación con varios aminoácidos patrón conocidos.*

1. Se hacen 5 aplicaciones en la placa cromatográfica:
 - Una de ellas corresponde al problema, mezcla desconocida de aminoácidos.
 - En las otras cuatro se aplican los testigos. Cada aplicación, una vez desarrollado el cromatograma y revelado, dará una mancha si sólo hay un aminoácido, y varias manchas (más o menos separadas) si en la disolución había una mezcla de aminoácidos.

Las disoluciones se aplican con un capilar de vidrio: el diámetro de la gota será como máximo de 2 mm y los puntos de aplicación deben distar 1 cm entre sí, así como del margen inferior, para que al desarrollar el cromatograma no interfieran unas manchas con otras.

El número de gotas que se deben aplicar en cada punto depende de la concentración de la disolución que se está utilizando. Para añadir una segunda gota en el mismo punto hay que esperar a que seque perfectamente la aplicación anterior.

2. Se introduce la placa en una cubeta de cromatografía, en la que previamente se ha puesto el disolvente o la mezcla de disolventes, teniendo mucho cuidado de que el nivel de disolvente no esté por encima de los puntos de aplicación. La placa debe apoyarse en la pared de la cubeta de la forma más vertical posible. Una vez introducida la placa, no se puede mover, desplazar o agitar la cubeta bajo ningún concepto.

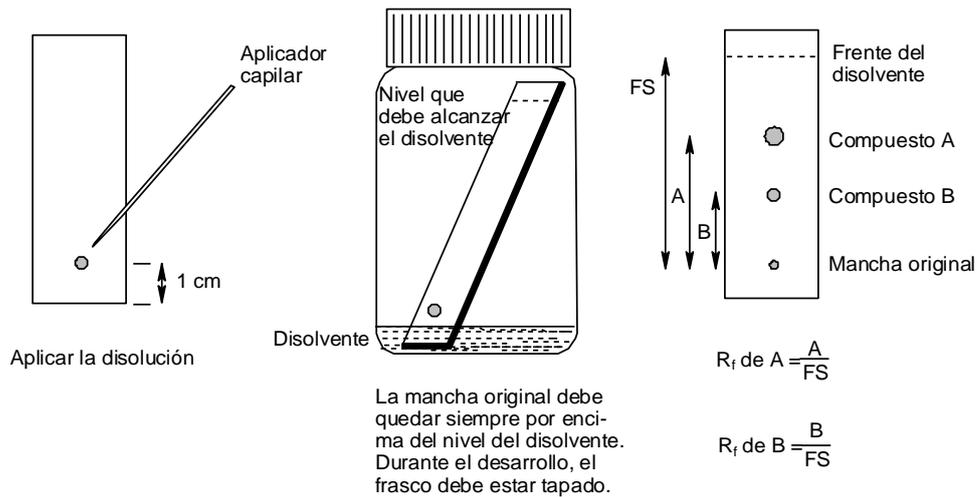
3. Se cierra cuidadosamente la cubeta con la tapa correspondiente y se espera el tiempo necesario para que el disolvente llegue hasta 1 cm antes del borde superior de la placa.

4. Se saca con cuidado la placa de la cubeta.

5. Se marca el margen la altura a la que ha llegado el disolvente y se deja a temperatura ambiente hasta que éste se evapore.

6. Se calienta en la estufa a 80 °C durante 5 min, para eliminar perfectamente el disolvente que quede retenido.

7. Se enfría la placa a temperatura ambiente y se procede a su revelado, pulverizando toda la placa con una solución de ninhidrina etanólica al 0.2 %. Para que se observe el color con nitidez es necesario calentar suavemente la placa en la estufa.
8. Se miden las distancias del punto de aplicación al centro de la mancha (A, B, ...) y del punto de aplicación al frente del eluyente (FS) y se calcula el R_f .
9. Se comparan los valores de R_f de las manchas problema con los de los testigos y se determina su identidad.

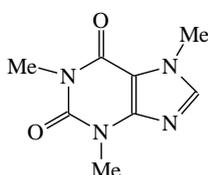


PRÁCTICA 4: EXTRACCIÓN

1. Objetivos

El *té* y el *café* han sido bebidas populares durante siglos, principalmente porque contienen el estimulante *cafeína*, que acelera la respiración, el latido del corazón, el sistema nervioso central y es diurético. Al mismo tiempo, puede producir nerviosismo e insomnio y, como muchas drogas, puede producir adicción. Este compuesto también se encuentra en el *chocolate* y se añade a las *bebidas de cola*. Junto con el alcohol, los calmantes y el tabaco es una de las drogas usadas habitualmente. Una taza de café contiene entre 60 y 100 mg, una de té la mitad, una chocolatina 10 mg y una lata de coca-cola 43 mg.

La cafeína pertenece a una clase de compuestos conocidos como *alcaloides*, de origen vegetal, que contienen nitrógenos básicos, presentan a menudo sabor amargo, y generalmente tienen propiedades fisiológicas. Su estructura es:



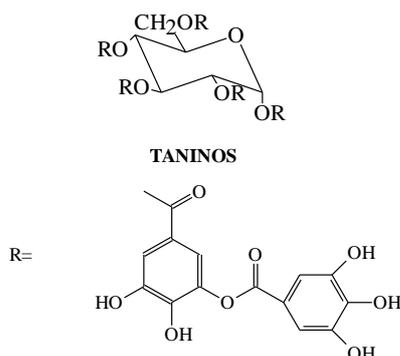
En esta Práctica se extraerá la cafeína que contiene una muestra de *té* y se identificará la cafeína obtenida como principio activo de un analgésico comercial.

1. Fundamento

1.1. Carácter básico de la cafeína

La cafeína no se halla sola en el *té*, sino que va acompañada de otros productos de los que hay que separarla. Las *hojas del té* contienen *taninos*, de carácter ácido, así como un cierto número de *pigmentos coloreados de tipo flavona*, junto a sus productos de oxidación, responsables del color marrón de sus infusiones, y pequeñas cantidades de *clorofilas*. La *separación de la cafeína* se basa en la distinta solubilidad de los componentes del *té*, tanto en agua como en disolventes orgánicos. *Las clorofilas son insolubles en agua*. En cambio, *la cafeína, los taninos y los derivados de flavona* son bastante *solubles en agua caliente*. Por tanto, la primera operación será la extracción de estos componentes.

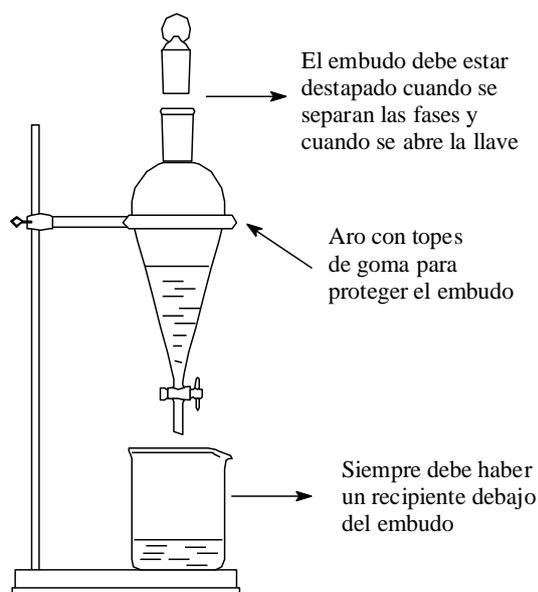
Tanto los *taninos* como los *flavonoides* tienen carácter ácido. Para asegurar que las *sustancias ácidas se desplazan a la fase acuosa* y que la *cafeína* se encuentra como *base libre*, se añade hidróxido sódico, que origina un *medio básico*.



La *cafeína libre* puede extraerse de esta fase acuosa con un *disolvente orgánico* como el diclorometano.

1.2. El proceso de extracción

En esta operación *los diferentes componentes de una mezcla se distribuyen entre las fases orgánica y acuosa de acuerdo con sus solubilidades relativas*. Por ejemplo, consideremos una mezcla constituida por un compuesto orgánico parcialmente soluble en agua y diferentes sales inorgánicas solubles en agua, con todos los componentes de la mezcla disueltos en la suficiente cantidad de agua para disponer de una disolución homogénea.



Para separar y aislar el compuesto orgánico de esta mezcla se dispone la disolución en un *embudo de separación* o *decantación*, se añade un disolvente orgánico inmiscible con el agua, se tapa el embudo y se agita. La cantidad total del compuesto orgánico presente en la disolución acuosa inicial se repartirá entre la fase etérea y la fase acuosa de acuerdo con las solubilidades relativas de dicho compuesto. Ahora bien, como el *compuesto orgánico* suele ser mucho *más soluble en un disolvente orgánico que en agua*, la mayor parte del compuesto orgánico habrá quedado disuelto en la fase orgánica y las sales inorgánicas, que no son solubles, permanecerán en la fase acuosa.

Mediante una *decantación en el embudo de separación* se separan las dos fases, se recoge la fase orgánica y se aísla el compuesto orgánico eliminando el disolvente.

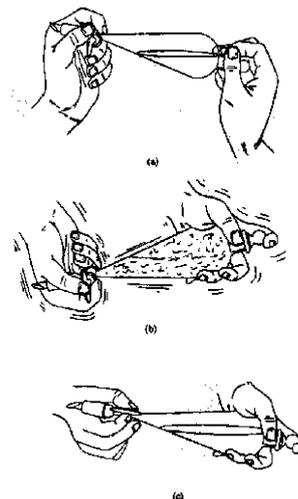
El *disolvente* que se utilice en la extracción debe cumplir los siguientes requisitos:

- Debe disolver fácilmente el (los) compuesto(s) orgánico(s) a extraer.
- Debe tener un punto de ebullición lo más bajo posible para que se pueda eliminar fácilmente en el rotavapor.
- Debe ser totalmente inmiscible con el agua.
- No debe reaccionar con los compuestos orgánicos a extraer.
- No debe ser inflamable ni tóxico.
- Debe ser relativamente barato.

No hay ningún disolvente universal que cumpla todos estos requisitos. El disolvente más utilizado en la extracción (el éter dietílico o, simplemente, *éter*) es muy inflamable y es parcialmente miscible con el agua. Por ello se emplean también otros disolventes inmiscibles con el agua, tales como los derivados halogenados (*cloroformo*, *diclorometano*, etc.) o los hidrocarburos (*hexano*, *éter de petróleo*, etc.). Los derivados halogenados son más densos que el agua, por lo que después de la extracción habrá que recoger la fase inferior (fase orgánica), y no son inflamables.

1.3. Manejo del embudo de extracción

Antes de comenzar la Práctica, el alumno deberá comprobar que el tapón y la llave del embudo de decantación están bien ajustados. El embudo de decantación debe manejarse con ambas manos (una mano debe estar sujetando el tapón, y la llave del embudo se abre y se cierra con la otra mano, manteniendo el embudo ligeramente inclinado hacia arriba). Se invierte el embudo hacia arriba, se abre la llave para *eliminar la sobrepresión de su interior*, se cierra la llave y se agita suavemente la mezcla durante 5-10 segundos, y se abre de nuevo la llave.



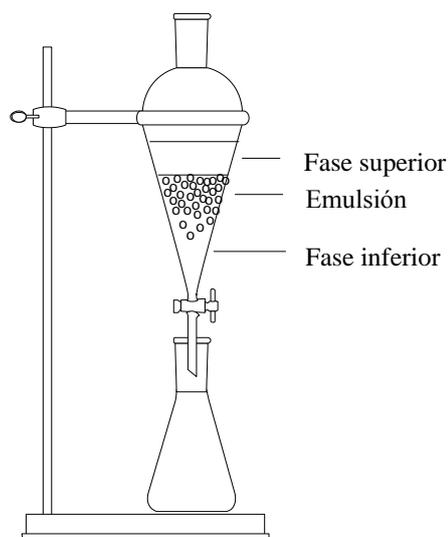
Cuando deje de aumentar la presión interior del embudo, se asegura el tapón, se cierra la llave y se agita enérgicamente durante uno o dos minutos. Se invierte el embudo ligeramente hacia arriba, se abre cuidadosamente la llave, se cierra y se apoya el embudo de decantación en un aro metálico, protegido con dos-tres trocitos de goma para evitar roturas. Finalmente, se *destapa* y se deja en reposo hasta que se observe una *separación nítida entre las dos fases*. En la parte inferior debe tenerse siempre dispuesto un vaso de precipitados con objeto de poder recoger todo el volumen contenido en el embudo por si éste se rompiese por accidente.

1.4. El problema de las emulsiones

Una *emulsión* es la *suspensión coloidal* de un líquido en el seno de otro. Es el problema que se presenta con más frecuencia en los procesos de extracción. El resultado es que las dos fases líquidas inmiscibles no se separan completamente, o se separan con mucha dificultad, quedando la emulsión en la *zona intermedia*.

Si se prevé de antemano que se puede formar una emulsión, lo mejor es intentar *evitarla agitando suavemente el embudo de extracción*, ya que cuanto más vigorosamente se agite, más emulsión se forma. En ese caso, en lugar de agitar, conviene invertir lentamente el embudo varias veces seguidas.

Las emulsiones, una vez formadas, son difíciles de romper. Para facilitar la separación completa de las dos fases, pueden seguirse los siguientes *consejos*:



a) Dejar el embudo en reposo, sin tapón, durante cierto tiempo y de vez en cuando girar el embudo alrededor de su posición vertical, ya que poco a poco ambas fases tienden a estabilizarse.

b) Añadir una disolución saturada de cloruro sódico y agitar suavemente, ya que la presencia de una elevada concentración de un electrolito fuerte en la fase acuosa contribuye a la separación.

c) Ayudar a la separación de ambas fases moviendo suavemente la interfase con una espátula.

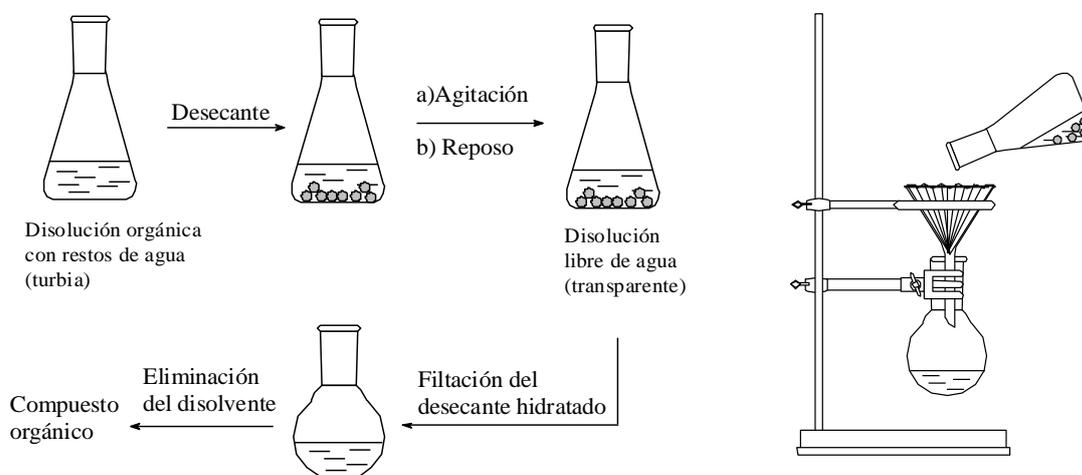
d) Si finalmente queda una pequeña cantidad de emulsión imposible de eliminar, se recomienda incorporarla a la fase orgánica y lavarla con disolución saturada de cloruro sódico para eliminar el residuo acuoso.

1.5. El proceso de secado

Una vez que se ha llevado a cabo una extracción, si la separación de las fases se ha realizado correctamente, la *cantidad residual de agua presente en la fase orgánica* es imperceptible ya que, además de estar en baja proporción, está en su mayor parte *disuelta en el disolvente*. Esta agua es la que se elimina empleando un agente desecante. Para ello se añade a la fase orgánica una cantidad de desecante proporcional a la cantidad de disolvente, suficiente para *cubrir el fondo del Erlenmeyer*. Se agita ligeramente el Erlenmeyer alrededor de su posición vertical, se deja en reposo y se tapa para evitar la evaporación del disolvente. Se espera un tiempo (generalmente es suficiente de 10 a 15 minutos), hasta que la *turbidez inicial desaparezca* y la disolución esté completamente transparente.

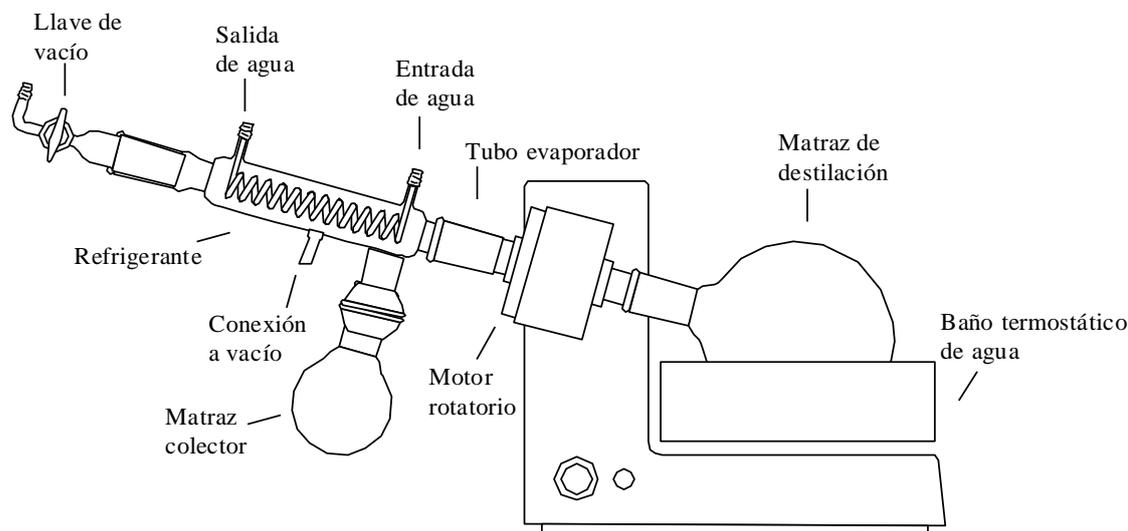
Los *agentes desecantes* más habituales son los denominados *reversibles*, que forman hidratos mediante una reacción de hidratación de sales anhidras con agua, por lo que si se calientan antes de separarse desprenderían de nuevo el agua retenida. Por ello estos desecantes tienen que *separarse antes de eliminar el disolvente*. En esta Práctica se utiliza como desecante el *sulfato magnésico, un desecante reversible de carácter universal*.

El *agente desecante hidratado se filtra por gravedad* sobre un matraz (figura 6) utilizando un embudo cónico y un *filtro de pliegues*. El Erlenmeyer, el agente desecante y el filtro se lavan abundantemente con el mismo disolvente para evitar pérdidas de producto. Finalmente, el *disolvente se elimina a presión reducida en el rotavapor*, aislándose de este modo el compuesto extraído, que posteriormente deberá purificarse.



1.6. Destilación a vacío mediante rotavapor

Una de las tareas más rutinarias en un laboratorio de síntesis orgánica consiste en la *eliminación de un disolvente orgánico* (de bajo punto de ebullición) de una *disolución* formada por dicho disolvente y un producto orgánico no volátil que queremos aislar. Casi todos los laboratorios están dotados de un aparato llamado *rotavapor*, que no es más que un *destilador a vacío*, que lleva incorporado un motor que permite el giro del matraz de destilación y por tanto la destilación continua de su contenido.



2.1. Parte experimental: Extracción de la cafeína del té

2.1.1. Material

- Aro de corcho
- Aro con nuez
- Embudo cónico
- Erlenmeyer de 100 mL
- Erlenmeyer de 250mL
- Embudo de extracción
- Granatario
- Matraz fondo redondo de 100 mL
- Papel de filtro
- Placa calefactora
- Rotavapor
- Vaso de precipitados de 250mL

2.1.2. Reactivos

- Té
- Diclorometano
- Sulfato magnésico anhidro
- Solución de NaOH al 5%

2.I.3. Procedimiento

1. Se introducen 4 bolsitas de té en un vaso de precipitados de 250 mL y se añaden 80 mL de agua destilada hirviendo.
2. Se deja la mezcla en reposo durante 5 minutos y se decanta a un Erlenmeyer.
3. Se extrae de las bolsitas la mayor cantidad posible de agua, teniendo cuidado de no romperlas, una vez que se hayan enfriado lo suficiente para manejarlas.
4. Se deja enfriar la solución a temperatura ambiente y se extrae tres veces con porciones de 15 mL de diclorometano, agitando el embudo suavemente para reducir la formación de emulsiones.
5. Se juntan las tres porciones de diclorometano y se trata la fase orgánica resultante con 25 mL de una solución de NaOH acuoso al 5%.
6. Se recoge la fase orgánica y las posibles emulsiones en un Erlenmeyer y se secan con sulfato magnésico anhidro. A partir de este momento, todo el material utilizado debe estar rigurosamente seco.
7. Una vez seca la disolución (totalmente transparente), se filtra a través de un filtro de pliegues.
8. Se lava el desecante con 10 mL de diclorometano y se une la disolución obtenida al filtrado.
9. Se elimina el disolvente a presión reducida en el rotavapor (en grupos de 3), empleando un matraz previamente tarado, y teniendo cuidado de no secarlo en exceso (la cafeína sublima).
10. Se pesa el residuo y se calcula el porcentaje en peso de cafeína en el té utilizado.

2.II. Parte experimental: Identificación de cafeína en un analgésico comercial

2.II.1. Material

- Algodón
- Capilar de vidrio
- Cubeta de cromatografía
- Placa de cromatografía
- Pipeta Pasteur
- Regla
- Tijeras
- Viales

2.II.2. Reactivos

- Aspirina
- Cafeína
- Cafiaspirina
- Etanol
- Acetato de etilo
- Ácido acético

2.II.3. Procedimiento: Identificación de cafeína en una analgésico comercial

Preparación de las muestras de aspirina y cafiaspirina (en grupo):

1. Se tritura cuidadosamente $\frac{1}{4}$ de pastilla del fármaco, aplastándola con la espátula entre papeles de filtro, hasta reducirla a un polvo fino.
2. Se coge una pipeta Pasteur y se introduce en ella un pequeño copo de algodón, humedeciéndolo con etanol, sin apretarlo excesivamente, hasta colocarlo en el estrechamiento de la pipeta.
3. Se transfiere el fármaco pulverizado al interior de la pipeta de forma que tengamos una "columna".
4. Con ayuda de una segunda pipeta, se añaden 5 mL de etanol a la "columna" por la parte superior y se recogen en un vial conforme salen por la parte inferior. En la "columna" nos quedarán los componentes de la pastilla utilizados como excipiente (generalmente almidón, celulosa microcristalina o gel de sílice).

Análisis por CCF (cada pareja):

1. Se hacen 3 aplicaciones en la placa cromatográfica:
 - Una de ellas corresponde a la cafeína extraída previamente, disuelta en etanol.
 - En las otras dos se aplican las muestras de fármacos preparadas. Cada aplicación, una vez desarrollado el cromatograma, dará una mancha si sólo hay un compuesto, y varias manchas (más o menos separadas) si en la solución había una mezcla de compuestos.

Las soluciones se aplican con un capilar de vidrio: el diámetro de la gota será como máximo de 2 mm y los puntos de aplicación deben distar 1 cm entre sí, así como del margen inferior, para que al desarrollar el cromatograma no interfieran unas manchas con otras.

2. Se examina la placa a la luz UV para comprobar que se ha aplicado suficiente compuesto en cada una de las manchas y, si es necesario, se añade algo más a alguna de ellas. El número de gotas que se deben aplicar en cada punto depende de la concentración de la disolución que se está utilizando. Para añadir una segunda gota en el mismo punto hay que esperar a que seque perfectamente la aplicación anterior.
3. Se introduce la placa en una cubeta de cromatografía, en la que previamente se ha puesto una mezcla de acetato de etilo / ácido acético 99:1 como eluyente, teniendo mucho cuidado de que el nivel de disolvente no esté por encima de los puntos de aplicación. La placa debe apoyarse en la pared de la cubeta de la forma más vertical posible. Una vez introducida la placa, no se puede mover, desplazar o agitar la cubeta bajo ningún concepto.
4. Se cierra cuidadosamente la cubeta con la tapa correspondiente y se espera el tiempo necesario para que el disolvente llegue hasta 1 cm antes del borde superior de la placa.
5. Se saca con cuidado la placa de la cubeta.
6. Se marca al margen la altura a la que ha llegado el disolvente y se deja a temperatura ambiente hasta que éste se evapore.
7. Se examina la placa a la luz UV y se dibujan con lápiz las manchas observadas. Se calculan los R_f de cada mancha y se identifica(n) el(los) principio(s) activo(s) de los analgésicos ensayados.