

Proyecto de Innovación Docente 2019-2020
Herramienta TAPA
Trabajo de Aplicación Práctica para el Alumnado

Grado: Farmacia

Módulo: Unidad Docente de Química Analítica (Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas)

Materia: Métodos instrumentales

Facultad: Farmacia

Curso: 2º

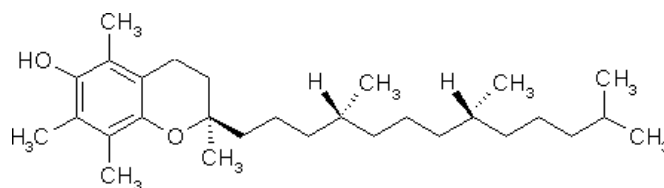
Asignatura: Química Analítica II

TAPA: Rulos primaverales (7)

Ingredientes por ración	Cantidad
Espárragos trigueros	60 g
Jamón serrano	60 g
Queso gouda	50 g
Aceite de oliva virgen extra	10 g
Sal	1 pizca (0,5 g)

El componente que vamos a identificar va a ser la Vitamina E (α - tocoferol), presente sobre todo en los espárragos trigueros y en menor medida, en el jamón serrano. Figura: Estructura química de la Vitamina E.

Fórmula empírica = $C_{29}H_{50}O_2$



TAREA 1.

Elección de la técnica instrumental

Hemos elegido esta **vitamina liposoluble** (antioxidante liposoluble más efectivo), debido a su gran importancia nutricional y efectos sobre la salud. Se trata de un **anti-oxidante natural**, es decir, protege el tejido corporal del daño causado por sustancias llamadas radicales libres. Estos radicales pueden dañar células, tejidos y órganos y por ello, están **relacionados con el envejecimiento**. Los tocoferoles son sustancias termolábiles y fotosensibles, que en presencia de oxígeno, se oxidan fácilmente por acción de la luz y de la temperatura, gracias a ello evitan la oxidación de otros compuestos lo que supone el efecto protector sobre el organismo.

Por otro lado, la Vitamina E está muy relacionada con el **mantenimiento del sistema inmunitario** frente a agentes patógenos, así como virus y bacterias y del sistema circulatorio, pues participa en la formación de glóbulos rojos y evita la coagulación de la sangre.

La mejor forma de incorporar la vitamina E en el organismo es a partir del **consumo de fuentes alimenticias**, ya que consumirla en alimentos no aporta riesgos ni es dañino. Sin embargo, en dosis altas de suplementos de vitamina E (suplementos de α -tocoferol) podrían incrementar el riesgo de una hemorragia cerebral (accidente cerebrovascular hemorrágico). Por ello, en los **alimentos** en los que podemos encontrar la vitamina E son: aceites vegetales de maíz, nueces, hortalizas de hoja verde, semillas, zumos, etc. Es muy importante su consumo, ya que una ingesta baja puede desencadenar en una anemia hemolítica.

El método anteriormente utilizado para la **determinación de la vitamina E en los alimentos** era una reacción de cloruro férrico que se reducía a iones ferrosos, los que forman un complejo de color rojo con *ajamipiridina*, o batofenantrolina (4,7-difenil-1,10-fenantrolina).

Se realizaba la reacción denominada **Emmerie-Engel** en extractos purificados de forma cromatográfica, después de saponificar las muestras y que era interferida por muchos componentes. Producía complejos más bien inestables y el tiempo de manejo complicaba el procedimiento, el cual requería mucho trabajo.

Se utilizó la cromatografía de gas por algún tiempo pero muy pronto se reconocieron las ventajas de HPLC, también considerando la posibilidad de separar simultáneamente α , β , γ , y δ -tocoferol, con esta técnica que estaba emergiendo.

TAREA 2.

Descripción del fundamento de la técnica

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), es una **técnica de separación** de los componentes de una mezcla. Basada en la **mayor o menor retención** que la fase estacionaria ejerce sobre cada una de las especies moleculares presentes en una mezcla problema arrastrada por una fase móvil líquida.

La fase estacionaria está ubicada en la columna y la fase móvil la atraviesa.

En este caso estamos empleando una **cromatografía líquido-líquido**. En el cual las fuerzas establecidas entre el soluto y la fase estacionaria son de **partición**, ocurre cuando la fase estacionaria es un líquido soportado sobre el relleno inerte, de modo que se establece un **equilibrio de partición** entre las fases móvil y estacionaria, ambas líquidas e inmiscibles, originándose este tipo de cromatografía.

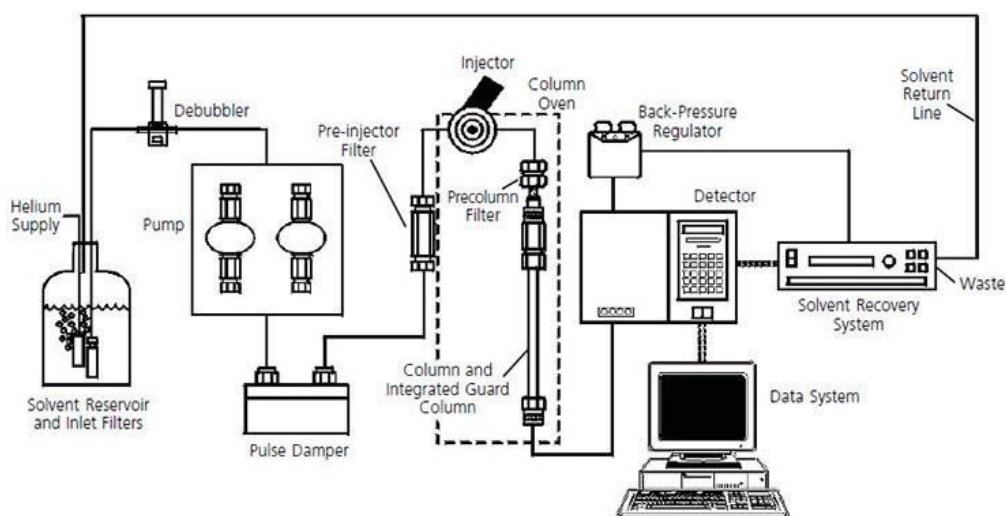
La modalidad que se emplea es una en **fase normal**, en donde la fase móvil es apolar (disolvente orgánico) y la estacionaria polar. Se ha escogido esta modalidad porque presenta una clara ventaja frente a la inversa, debido a que en la normal todos los vitámeros son separados y en la inversa no.

La muestra en solución es **inyectada en la fase móvil**. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las **interacciones no-covalentes** de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los tocoferoles.

TAREA 3. Esquema del equipo nstrumental empleado

Sabemos que el equipo instrumental empleado en la cromatografía líquida de alta eficacia consta de: reservorio, sistema de bombeo, sistema de inyección, columna cromatográfica y detector.

A grandes rasgos, la técnica consiste en **hacer fluir** la fase móvil (apolar) depositada sobre el reservorio hasta la columna mediante un sistema de bombeo. La muestra se **introduce por el sistema de inyección**, donde se mezclará con la fase móvil que viaja del reservorio a la columna. Posteriormente, en la columna se separa la muestra y cuando sale de ella llega a detector, donde se obtiene un registro.



A continuación vamos a describir individualmente cada **componente** del equipo instrumental:

- **Reservorio:** suelen ser frascos de vidrio, en cuyo interior se encuentra la fase móvil. Entonces, el número de reservorios empleado dependerá del número de fases móviles diferentes que se vayan a utilizar. Nosotros vamos a emplear como fase móvil **hexano**, ya que estamos realizando una cromatografía en fase normal

En él también están incluidos los sistemas de tratamiento de los disolventes, cuya función es eliminar gases disueltos o partículas en suspensión que producen un ensanchamiento de los picos del cromatograma. Y podrá haber una cámara de mezcla en el caso de realizar una elución en gradiente.

- **Sistema de bombeo:** como ya se ha mencionado anteriormente, este sistema se encarga de recoger la fase móvil y transportarla a la columna. Es muy importante que sea resistente a la corrosión, y evitar el plástico, ya que los disolventes que se utilizan de fase móvil suelen ser muy corrosivos.

Está formado por una cavidad que presenta un pistón unido a un motor. Cuando el pistón se mueve hacia la izquierda hace subir la fase móvil y llena la cavidad; por otro lado, cuando se mueve hacia la derecha, la fase móvil se dirigirá a la columna. Son válvulas anti-retorno para que una vez que el disolvente se ha mandado a la columna no pueda volver a la bomba.

- **Sistema de inyección:** permite introducir pequeñas cantidades de muestra reproducibles (y exactas), y evita despresurizar el sistema.

El sistema de válvulas tiene un bucle y un sitio para inyectar la muestra. Se inyecta en posición load, la muestra se quedará en el bucle de la parte posterior e irá a la columna cuando se pasa a inyectar.

- **Columna analítica:** permite la separación de la muestra, y contiene el material de relleno sobre el que se fija la fase estacionaria.

En nuestro caso, vamos a emplear una **columna de sílice** para elución en fase normal. Por otro lado, la fase estacionaria es polar, y usaremos **Lichrosorb Si 60 (Merck)**

Puede presentar una precolumna o columna protectora: se coloca delante de la columna analítica para evitar su deterioro, ya que elimina la materia en suspensión, contaminantes de los disolventes y componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria, alterando el equilibrio de distribución.

- **Detector:** en este caso emplearemos detectores de fluorescencia UV-Visible, ya que se basan en la capacidad de algunos solutos (como la vitamina E) capaces de emitir fluorescencia (en nuestro caso a 330 nm)

La ventaja de este tipo de detectores es su alta sensibilidad, mucho mayor que en los métodos absorciométricos. Además, son muy selectivos.

TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

El tratamiento previo empleado para el análisis de la vitamina E consiste en primer lugar en una **saponificación alcalina** (empleando por ejemplo un tampón de fosfato sódico ajustado a pH 7) de las muestras, seguida posteriormente de la eliminación del material **no saponificable** con un disolvente orgánico adecuado. Para proceder a este tratamiento, se extraen previamente, por

separado, los espárragos y el jamón serrano; más adelante, se trituran bien (empleando por ejemplo un instrumento como una batidora) hasta conseguir una mezcla homogénea

En este caso, se va a saponificar entre 2-10 gramos de las muestras (el procedimiento que se empleara será aplicable para ambos alimentos pero el tratamiento descrito será para el jamón) bajo nitrógeno utilizando una mezcla de etanol y metanol, agua, un antioxidante e hidróxido de potasio acuoso. Es importante saber que los tocoferoles son **muy sensibles al oxígeno** en un ambiente alcalino de tal manera que tanto el alcohol como el antioxidante habrá que agregarlos previos a la adición de hidróxido de potasio.

A continuación, los tocoferoles son extraídos de la muestra saponificada por medio de un **solvente adecuado** (como por ejemplo:éter dietílico, tertbutil metil éter, n-hexano, empleandolo unas 3 o 4 veces con volúmenes que pueden variar desde 50 mL hasta 150 mL); más tarde, esos extractos se lavaran con agua. Referencia: FAO. (2011). *Análisis de vitaminas liposolubles en alimentos*. <http://www.fao.org/3/AH833S19.htm> (Consulta el 1 de Diciembre de 2019)

Después, se agrega aproximadamente 2- 5 mg de piro- galol al extracto antes de la evaporación.

Finalmente, el residuo es redisoluto utilizando de preferencia la fase móvil u otro solvente compatible con HPLC de tal modo de obtener una concentración apropiada para la inyección dentro de la columna. Esta será la **solución final que inyectamos a la columna**.

Para la identificación y cuantificación del compuesto α -tocoferol en una muestra problema, deberemos realizar una cromatografía previa, para establecer una comparación entre el cromatograma de una disolución patrón y la muestra problema.

Después del **pretratamiento de la muestra**, se va a proceder a la realización de la cromatografía. Como se ha comentado en los apartados, se va a realizar una cromatografía de carácter normal, donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar

El proceso de inyección de la muestra es un proceso delicado, fundamentalmente, porque **se deberá limpiar la aguja** con alcohol cada vez que la empleamos para evitar que se contaminen las muestras. Como ya se ha comentado, se realizara previamente cromatogramas, con la disolución patrón para después luego compararlo con los resultados obtenidos en el cromatograma de la muestra problema.

La **detección** se realiza preferentemente mediante **fluorescencia** debido a su mayor selectividad así como también por los menores límites de detección obtenidos si se compara con UV. Después, se procederá al cálculo mediante un cálculo aproximado midiendo la base y la altura (para el área) de los picos obtenidos de los tocoferoles o usando el dato que te ofrecerá el cromatograma acerca del área de los picos.

REFERENCIAS TAREA 1

Noviembre 2019. “Vitamina E” (en línea). https://es.wikipedia.org/wiki/Vitamina_E (consultado 10 Noviembre 2019)

“Análisis de Vitaminas liposolubles en alimentos” (en línea). <http://www.fao.org/3/AH833S19.htm> (consultado 10 Noviembre 2019)

DrTango. Febrero 2019. “Vitamina E” (en línea). <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002406.htm> (consultado 10 Noviembre 2019)

Departamento de Química Analítica en ciencias farmacéuticas. “Cromatografía”.
Prácticas de Química Analítica II. Facultad de Farmacia.

REFERENCIAS TAREA 2

Departamento de Química Analítica en ciencias farmacéuticas. “Cromatografía”.
Prácticas de Química Analítica II. Facultad de Farmacia.

REFERENCIAS TAREA 3

Departamento de Química Analítica en ciencias farmacéuticas. “Cromatografía”.
Prácticas de Química Analítica II. Facultad de Farmacia.

Departamento de Química Analítica en ciencias farmacéuticas. “Cromatografía”.
Diapositivas de clase Química Analítica. Facultad de Farmacia.

REFERENCIAS TAREA 4

Santos Arnaiz, C. (2012). *Elaboración de jamones curados y cocidos enriquecidos en ácidos grasos n-3 y tocoferoles* (Tesis doctoral). Madrid: Ediciones de la Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/17872/1/T34130.pdf>

FAO. (2011). *Análisis de vitaminas liposolubles en alimentos*. <http://www.fao.org/3/AH833S19.htm> (Consulta el 1 de Diciembre de 2019)