

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es la determinación del contenido de etanol en cerveza mediante Análisis por Inyección de Flujo (FIA)

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los métodos automáticos para el análisis de muestras en disolución se suelen clasificar en:

–Discontinuos.

–Continuos: * Flujo segmentado.

* Flujo no segmentado.

–Robotizados.

El FIA es un método automático de análisis en flujo continuo no segmentado, cuya característica fundamental es el uso de una corriente continua de líquido en la que se introduce la muestra; no tenemos segmentos de aire que nos separen las muestras. Después, esta corriente confluye con otra corriente de reactivo. La corriente líquida que se forma es transportada a través de un sistema de tubos hacia el reactor y seguidamente va el detector que mide el producto de reacción que nos interesa.

Los rasgos esenciales del FIA son:

–El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA.

–La muestra líquida es inyectada directamente en el flujo.

–Se realiza un transporte de la muestra inyectada a través de un sistema de canales en los cuales puede tener un proceso físico–químico adicional, como por ejemplo una reacción química.

–La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible, que da lugar a un gradiente de concentración variable con el tiempo a lo largo del sistema.

–La señal que proporciona el sistema de detección continua es transitoria.

–En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado ni el equilibrio químico ni el físico.

–El tiempo de operación debe ser reproducible, pues las medidas se realizan en condiciones de no–estabilidad y por lo tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir grandes alteraciones de los resultados.

Los componentes básicos de un sistema FIA son los siguientes:

Fotocopia 1

- *Unidad de propulsión.*

La unidad de propulsión tiene como misión establecer un flujo de caudal lo mas constante posible, ausente de impulsos y perfectamente reproducible. Esto se puede conseguir por la simple acción de la gravedad, mediante un sistema de presión gaseosa o con una bomba peristáltica.

En la práctica utilizaremos una bomba peristáltica que consiste en un tambor que contiene una serie de rodillos que comprimen un tubo flexible por el que circula el reactivo o el portador.

- *Sistema de inyección.*

Este componente del sistema tiene como misión situar una cantidad perfectamente definida de muestra en el portador.

En los sistemas antiguos de FIA utilizaban jeringas, pero su uso ocasionaba un cambio transitorio en el flujo, que producía un pico agudo e irreconocible. Por este motivo se tuvo que cambiar el sistema de inyección.

Actualmente se utilizan válvulas de inyección rotatorias. Tienen seis orificios, tres de entrada y tres de salida, que pueden estar en dos posiciones:

- De carga
- De inyección

Con este sistema se consigue una buena reproducibilidad de los volúmenes suministrados, rapidez y facilidad de manejo, así como una aceptable capacidad de automatización.

Fotocopia2

- *Zona de reacción*

Puede ser diferente dependiendo de la cinética de la reacción. Si la cinética es rápida se utilizan reactores de corta longitud o reactores de tubo liso. Si la cinética es lenta se pueden utilizar tubos con cámara de mezcla o un serpentín de una determinada longitud.

- *Sistema de detección. (Espectrofotómetro)*

Un detector para que resulte adecuado en FIA, deberá poseer las siguientes características: Pequeño volumen, bajo nivel de ruido, señal independiente del caudal, respuesta rápida y lineal en un amplio margen de concentraciones y alta sensibilidad.

En la práctica utilizaremos como detector un espectrofotómetro uv/visible. La célula que utilizamos es una célula de flujo acoplada, es de cuarzo y tiene dos orificios, uno de entrada y otro de salida. El paso óptico es de 1 cm y el volumen es de 50 l..

La señal analítica que se obtiene en un sistema FIA se denomina Fiagrama y es una representación de la señal medida frente al tiempo. En nuestra práctica mediremos absorbancia. Cuando una sustancia recibe radiación monocromática parte la absorbe y parte la transmite; la cantidad de radiación absorbida por una muestra viene dada por la Ley de Lambert–Beer:

$$A = \text{Log}(I/I_0) = Ebc$$

En el Fiagrama tenemos muchos parámetros para obtener información, pero nosotros utilizaremos la absorbancia en el máximo de cada pico.

El transporte de materia en los sistemas FIA se produce en régimen laminar ($Re \ll 2000$), lo que origina un perfil parabólico de velocidades al circular las partículas interiores del fluido más rápidas que las exteriores. Rápidamente el transporte se debe a la difusión axial –producida por un gradiente de concentración horizontal– y a difusión radial– producida por la diferencia de concentración entre puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo–. El que predomine un transporte u otro depende del tiempo que la muestra tarde en llegar desde el sistema de inyección a la zona de reacción. Nosotros buscaremos que el transporte sea una mezcla de ambos tipos de difusión, para eso necesitamos controlar el caudal y la longitud del reactor. En FIA se suele trabajar con caudales de entre 0.5 y 2 ml/min y con reactores de entre 50 y 200 cm.

La reacción que tendrá lugar en nuestro reactor es de tipo enzimático. Las enzimas son catalizadores biológicos muy específicos, que se unen al reactivo o sustrato a través de su centro activo y que facilitan la reacción disminuyendo la energía de activación del sustrato. El centro activo de una enzima tiene una serie de características:

- Carácter tridimensional
- Elevada especificidad tanto para el reactivo como para el sustrato
- Alta eficacia
- Rapidez
- Se puede usar fuera de los organismos

La unión entre la enzima y el sustrato puede explicarse mediante el modelo de llave–cerradura o mediante el modelo de encaje inducido.

Fotocopia3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

• *La reacción*

En esta práctica mediremos el contenido en etanol de una cerveza determinada. Para ello estudiaremos la siguiente reacción que tiene lugar en el reactor (serpentín de reacción)



Coenzima. Especie a medir.

Tratándose de una reacción de cinética lenta, la aplicación del análisis por inyección de flujo permite un aumento considerable de la velocidad de análisis, ya que al medirse a tiempos prefijados y reproducibles, no es necesario esperar a que se alcance el equilibrio para efectuar la determinación. Se consigue también un ahorro de reactivos.

Mediremos la concentración de NADH que se forma en la reacción ya que esta medida nos dará la concentración de etanol en la muestra. El pH óptimo de trabajo, que obtendremos con un tampón pirofosfato, es de 8.7.

• *Reactivos*

*Tampón Pirofosfato

Se pesan 8.36 g de Pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 2.21 g de cloruro sodio (NaCl), 0.39 g de glicina ($\text{H}_2\text{N--CH}_2\text{--COOH}$), 1 g de sulfato amónico $\{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\}$ y 2.09 g de clorohidrato de semicarbacida

(CH₆CINO₃) y lo disolvemos todo en unos 200 ml de agua destilada. Lo disolvemos bien y con la ayuda de un pH-metro se mide el pH. En nuestro caso es de 6.6, por lo que con ayuda de una disolución de NaOH 2 M habrá que llevarlo hasta el pH de 8.7 (pH óptimo) Una vez que tenemos la disolución a pH 8.7, la introducimos en un matraz de 250 ml y enrasamos con agua destilada.

*Disoluciones patrón.

Partimos de una cerveza certificada con un contenido en etanol de 4.75 ml/100ml. 5 ml de esta cerveza los llevamos a un matraz de 1000 ml y los enrasamos con agua destilada, obteniéndose una disolución madre con un porcentaje en alcohol de 187.47 mg/l. A partir de esta disolución preparamos distintas diluciones que serán los patrones para el calibrado.

- 1/100: 1 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 1.87 mg/l
- 2/100: 2 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 3.74 mg/l
- 3/100: 3 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 5.62 mg/l
- 4/100: 4 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 7.50 mg/l
- 5/100: 5 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada 9.37 mg/l
- 6/100: 6 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 11.25 mg/l
- 8/100: 8 ml en un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 15.00 mg/l
- 10/100: 5 ml en un matraz de 50 y enrasamos con agua destilada. 18.07 mg/l
- 12/100: 6 ml en un matraz de 50 y enrasamos con agua destilada. 22.49 mg/l
- 15/100: 15 ml a un matraz de 100 y enrasamos con agua destilada. 28.12 mg/l

*Disolución de reactivo

En 250 ml de la disolución tampón se disuelve 80 mg de NAD y 100 mg de enzima ADH

- *Montaje del sistema FIA*

Se monta el sistema de flujo como se indica en el sistema siguiente y se ajustan las condiciones en las que vamos a operar.

Fotocopia4

Para montar los canales de la válvula rotatoria se sigue un código de colores:

- 1.Negro: entrada bucle
- 2.Amarillo: salida de bucle
- 3.Rojo: entrada del portador
- 4.Blanco: salida del portador
- 5.Verde: entrada de muestra
- 6.Azul: salida de muestra

El mecanismo trabaja de la siguiente manera: por el canal de portador fluye una corriente de agua destilada en la que se inyectan los patrones de cerveza. La inyección se hace con la ayuda de la válvula; primero se pone la válvula en posición de carga, cargándose el bucle y después se pone en posición de descarga inyectándose la muestra al sistema.

Esta corriente confluye con la disolución de enzima y coenzima en tampón pirofosfato que circula por otro canal al mismo caudal. En estas condiciones se produce la reacción en el serpentín de tubo de teflón de 1 m de largo y 0.5 mm de diámetro interno. Una vez que se pasa el serpentín la mezcla resultante llega al detector, en el cual, a través de una célula de cuarzo y a longitud de onda de 340 nm se mide la absorbancia del NADH.

- *Recta de calibrado*

El siguiente paso es ajustar la bomba peristáltica a un caudal de 1 ml/min. Una vez que tenemos preparado el equipo nos disponemos a obtener la línea de calibrado. Éste se obtiene inyectando los patrones de menor a mayor concentración y registrando la absorbancia. La inyección de cada patrón la realizamos las veces necesarias hasta que obtengamos resultados representativos, con esas señales hacemos una media y hacemos una tabla concentración(mg/l)–absorbancia.

Conc					9.37	11.25	15.00	18.7	22.49	28.12
mg/l	1.87	3.74	5.62	7.50						

En la fotocopia 1 se muestra la modalidad de trabajo en la que actúa el detector. También se muestra el Diagrama correspondiente a los patrones del calibrado

En la fotocopia 2 se muestra la recta de calibrado

- *Preparación de las réplicas*

La muestra a la que nosotros vamos a calcular su concentración en etanol viene etiquetada con el número de control A01082.

Lo primero que hacemos es calcular la densidad de esta cerveza para poder pasar la concentración de mg/l a porcentaje en peso. Esto se hace pipeteando un volumen conocido de muestra(5 ml) y pesándolo. Lo repetimos tres veces y obtenemos una densidad de 1.00823 g/cm³. Una vez que conocemos la densidad de la muestra problema pipeteamos 5 ml y los llevamos hasta un volumen de 1000 ml con agua destilada en un matraz aforado. De esta manera preparamos una disolución madre de la que prepararemos las réplicas. Para ello, de la disolución madre pipeteamos 8 ml y los llevamos a un volumen de 100 ml con agua destilada en un matraz aforado. Esta operación la repetimos 5 veces para obtener 5 réplicas.

Una vez preparadas todas las réplicas las introducimos en el FIA y medimos su absorbancia. Posteriormente esta absorbancia la introduciremos en la recta de calibrado y podremos conocer la concentración de la cerveza.

Réplica	1	2	3	4	5
A	0.111	0.115	0.112	0.114	0.1155

- *Resultados*

La ecuación de la recta de calibrado se muestra en la fotocopia 2 y a partir del programa de cálculo podemos determinar la concentración en etanol de la cerveza problema. Obtenemos que es de 14.2435 ± 0.843 mg/l. Teniendo en cuenta las diluciones 100/8 y 1000/5 obtenemos que la concentración es de 35608.75 mg etanol/l cerveza. A partir de la densidad calculamos la concentración en tanto por ciento en peso de etanol:

$$\% \text{ peso} = (35608.75 / 1.00823 \cdot 106) \times 100 = 3.5318 \text{ mgetanol} / 100 \text{ mgcerveza.}$$

Teniendo en cuenta los errores obtenemos que:

$$Er = \sqrt{[(0.843/14.2435)^2 + (0.08/100)^2 + (0.01/8.00)^2 + (0.30/1000)^2 + (0.01/5)^2 + (0.00014/5.0411)^2]}$$

$$Er = \pm 0.059$$

$$Eabs = \pm 0.20902$$

Por lo tanto podemos decir que:

$$\% \text{ peso} = 3.53 \pm 0.21 \text{ mg etanol/100 mg cerveza}$$

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por los grupos anteriores por lo que debemos pensar que son más o menos correctos.

En una de las medidas la absorbancia se alejaba mucho del resto, esto se debió a la presencia de alguna burbuja de aire, lo que nos lleva a pensar lo importante que es que todos los conductos estén perfectamente acoplados para evitar la entrada de estas pequeñas burbujas que puedan estropear las medidas.

1