

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CUANTIFICACION DEL ACIDO  
ASCORBICO (VITAMINA “C”) EN JUGO DE NARANJA UTILIZANDO EL  
METODO DE TITULACION YODOMETRICA A MICROESCALA Y  
YODIMETRICA A MACROESCALA .”**

Trabajo de Graduación presentado por:

**Br. RICARDO EMMANUEL HERNANDEZ VÁSQUEZ**

**Br. ROSA CAROLINA PINEDA CORNEJO**

Para optar al Grado de:

**LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

**OCTUBRE, 2003**

**San Salvador, El salvador, Centro América**



**©2004, DERECHOS RESERVADOS**

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTORA**

**DRA. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ**

**SECRETARIA GENERAL**

**LIC. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA**

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

**LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO**

**SECRETARIA**

**LIC. MIRIAM DEL CARMEN RAMOS DE AGUILAR**

**ASESORA**

MSC. Y LIC. SONIA MARICELA LEMUS

**JURADO CALIFICADOR**

LIC. ZOILA VERÓNICA SAGASTUME HENRÍQUEZ

LIC. MERCEDES DEL CARMEN GÓMEZ DE DÍAZ

LIC. ZENIA IVONNE ARÉVALO DE MÁRQUEZ

## **AGRADECIMIENTO**

**A Dios Omnipotente** por habernos permitido llegar a la culminación de nuestra carrera dándonos las fuerzas, salud, sabiduría y el entendimiento necesarios para lograrlo.

**A nuestros padres**, gracias por el total e incondicional apoyo brindado en toda nuestra vida, por haber depositado en nosotros su confianza y darnos esta oportunidad de superación.

**A mi Esposo(a)**, Por preocuparse por este cúlmen y poner sus fuerzas, tiempo, comprensión, amor y total interés en lograrlo.

**A nuestros hijos**, Pues son la razón más fuerte para lograr nuestras metas; son el motor que impulsa nuestras vidas a salir adelante, superándonos cada día más para procurarles un mejor futuro. Dieguito y Eduardito : los Amamos.

**A nuestros hermanos**, por estar a nuestro lado cuando fuera necesario y brindarnos su ayuda incondicional.

**A nuestros abuelos**, por permanecer al pendiente de los progresos y celebrarlos con nosotros.

**Al personal docente** de nuestra querida facultad, puesto que sin su enseñanza este triunfo no habría sido logrado. Gracias por compartir sus conocimientos y por sus

exigencias para sacar lo mejor de cada uno de nosotros reconociendo nuestras habilidades y aptitudes.

**A nuestros compañeros** de promoción por ser un apoyo importante en muchas facetas de nuestra carrera.

**A todas las personas e instituciones** que colaboraron con nosotros para lograr alcanzar la meta...

A todos ustedes mil gracias y que Dios nuestro padre amoroso les recompense su colaboración y les llene de mil bendiciones.

Rosa Carolina y Ricardo

## **DEDICATORIA**

A **Dios**, pues es el centro de nuestras vidas; y es para El que existimos.

A la **Virgencita María** por el amor que nos ha brindado como Madre y su intercesión a nuestras peticiones.

A mis padres, hermanos y demás familia, pues sin su apoyo no habría logrado culminar mi carrera, siendo este logro parte de los suyos.

A mi esposo e hijos por ser el motivo para quienes vivir y por quienes velar.

A todas las nuevas generaciones como un aporte más para sus conocimientos.

Rosa Carolina

## **DEDICATORIA**

**A Dios Todopoderoso**, por haberme permitido terminar este trabajo. Por ser tan providencial y amoroso con nosotros sus hijos.

A nuestra madre siempre fiel, la **Virgen María**. Por enseñarnos a ser tenaces y a nunca desmayar.

**A mis padres Ricardo y Emma** por tener su apoyo incondicional en todo momento, por su amor, paciencia y comprensión.

**A mamá Toña**, quien desde el cielo nos esta viendo. Gracias por su amor e incondicional apoyo. Con mucho amor para tí.

**A mi esposa e hijos** (Carolina, Dieguito y Eduardito) por ser el sentido de mi trabajo y esfuerzo por superarme cada día más. Los amo mucho.

**A mis hermanos, primos, tíos y sobrinos .**

**A todos mis amigos en general.**

Ricardo

## ABREVIATURAS

**2,6-DCFIF** = 2,6-Diclorofenol – Indofenol .

**ACS** = Sociedad Americana de Química o American Society of Chemistry.

**EPA** = Agencia de Protección Ambiental.

**H.A.C.C.P** = Análisis de Riesgo y de Puntos Críticos de Control o Hazard Analysis and Critical Control Points.

**MDEQ** = Departamento de Calidad Ambiental de Michigan o Michigan Departmet of Envairomental Quality.

**MRI** = Instituto de Investigación de Medio Oeste o Midwest Research Institute.

**RDA** = Ingesta diaria recomendada.

**RSC** = Real Sociedad de Química o Real Society of Chemistry



## INDICE GENERAL

CONTENIDO	N° Página
I. INTRODUCCIÓN.....	i
II. JUSTIFICACIÓN.....	iv
III. OBJETIVOS .....	vii
1. Objetivo General.....	vii
2. Objetivos Específicos.....	vii
CAPITULO I.....	9
1.0. MARCO TEORICO.....	10
1.1. Orígenes de la química a microescala.....	10
1.2. Teoría sobre la filosofía de “la Química verde”.....	12
1.3. ¿Qué es la “Química verde”?.....	14
1.4. Principios de la Química verde.....	14
1.5. Definiciones de Química a microescala.....	19
1.6. Beneficios de la química a micro escala :.....	21
1.7. Fundamentos de la Química a Microescala.....	22
1.8. Microtitulaciones:.....	23
1.9. Titulaciones a Macroescala.....	25
1.10. Generalidades de la vitamina C.....	26
1.11. Micro análisis de la Vitamina “C”......	27
1.12. Titulación Yodimétrica de Vitamina “C” a Macroescala.....	29
1.13. Comparación de las técnicas a Macro y Microescala.....	30

CAPITULO II .....	33
2.0. METODOLOGÍA .....	34
2.1. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	34
2.1.1. Metodología de Análisis de Acido Ascórbico materia prima por el Método Yodimétrico a Macroescala.....	34
1) Marcha del Análisis a Macroescala de Vitamina “C” materia prima por el método Yodimétrico. ....	35
2.1.2. Metodología de análisis de solución estándar de concentración conocida de vitamina “C” con Tiosulfato de Sodio $3.0 \times 10^{-4}$ M a Microescala. ....	36
2) Marcha del Análisis a Microescala para solución estándar de concentración conocida de vitamina “C” utilizando Tiosulfato de Sodio como titulante.....	36
2.1.3. Metodología de análisis a Microescala para la determinación de vitamina “C” en jugo de naranja con Tiosulfato de Sodio $3 \times 10^{-4}$ M. ....	37
3) Marcha del Análisis a microescala para la cuantificación de Vitamina “C” en jugo de naranja utilizando Tiosulfato de Sodio $3 \times 10^{-4}$ M como titulante. ....	37
2.1.4. Metodología de análisis sugerido por AOAC utilizando 2,6- dicloroindofenol como titulante.....	38
4) Marcha del Análisis Macroescala de Vitamina “C” en jugo de naranja por el método oficial utilizando el reactivo 2,6-Dicloroindofenol.....	40
2.2. METODOLOGÍA DE CALCULOS.....	41
2.2.1. Cálculo de miligramos de vitamina “C” materia prima por el método Yodimétrico a Macroescala.....	41
2.2.3. Cálculo de miligramos de Vitamina “C” en jugo de naranja por el método de titulación 2,6-DCFIF .....	44
2.2.4. Cálculo de Incerteza:.....	45
2.2.4.1. Cálculo de la incerteza en la titulación de estándar de vitamina “C” por el método a microescala.....	46

2.2.4.2. Cálculo de la incerteza en la titulación de estándar de vitamina “C” por el método a Macroescala.....	47
2.2.4.3. Cálculo de la incerteza en la medida en la valoración de jugo TAMPICO por el método a microescala.....	48
2.2.4.4. Cálculo de la incerteza en la medida en la valoración de jugo TAMPICO por el método a macroescala 2,6- DCFIF. ....	49
2.3. TRABAJO DE CAMPO .....	50
2.3.1. Análisis a Microescala .....	50
2.3.2. Análisis a Macroescala.....	53
2.3.3. Comparación del análisis en jugos siguiendo el análisis oficial, 2,6-dicloroindofenol; propuesto por “official methods of análisis (AOAC)”.....	53
CAPITULO III.....	55
3.0. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	56
3.1. Análisis de ácido ascórbico en materia prima.....	56
3.2. Análisis de Vitamina C en jugos de naranja. ....	58
3.3. Comparación de los métodos estudiados. ....	63
IV. OBSERVACIONES .....	65
V. CONCLUSIONES. ....	68
VI. RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA .....	73
ANEXOS .....	75
ANEXO 1.....	76
Preparación de Reactivos .....	76
a) Preparación de Reactivos para el método Yodimétrico a Macroescala. ....	76
b) Preparación de reactivos para el Método Yodométrico a Microescala.....	77
ANEXO 2. Costos en la implementación de un laboratorio a microescala. ....	79

ANEXO 3. Calibración de las micro buretas (jeringas).....	80
a) Calibración de las jeringas para el Tiosulfato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) .....	80
b) Calibración de las jeringas para el Yoduro de Potasio ( $\text{KIO}_3$ ) .....	81
c) Calibración de las jeringas para el Acido Ascórbico (Vitamina C).....	81
ANEXO 4. Ejemplo de metodología de cálculos.....	82
ANEXO 5. Certificado de análisis del Acido Ascórbico.....	83
ANEXO 6. Tabla de densidades del agua a diferentes temperaturas.....	84
ANEXO 7. Manual de laboratorio .....	85

## INDICE DE TABLAS

N° de tabla	N° Página
Tabla 1. Volumen de reactivos químicos requeridos para todos los experimentos realizados durante un semestre universitario.....	31
Tabla 2. Volumen de desecho generado por categoría (Todos los desechos deberán ser tratados o depuestos apropiadamente).....	32
Tabla 3. Comparación de costo y tiempo.....	32
Tabla 4. Valores obtenidos en gramos en la titulación de la solución estándar de Acido Ascórbico de concentración conocida (400mg) mediante el método a Macroescala.....	41
Tabla 5. Resultados obtenidos mediante el análisis oficial con 2,6-DCFIF del jugo de naranja “TAMPICO” ®.....	44
Tabla 6. Datos obtenidos de valoración estándar de vitamina “C” (1mg/ml) por el método a Microescala con solución de Tiosulfato $3 \times 10^{-4}$ M (corregida).....	46
Tabla 7. Valores obtenidos en mililitros de titulantes (yodo) en la valoración del estándar Acido Ascórbico de concentración conocida (400mg) mediante el método a Macroescala.....	47
Tabla 8. Resultados del ensayo a microescala del jugo de naranja marca “TAMPICO” ®.....	48
Tabla 9. Resultados obtenidos mediante el análisis oficial con 2,6-DCFIF del jugo de naranja “TAMPICO” ®.....	49

Tabla 10. Valoración de solución estándar de Vitamina “C” 1.0 mg/ml con el método a Microescala.....	56
Tabla 11. Datos obtenidos de valoración estándar de vitamina “C” (1mg/mL)* por el método a Microescala con solución de Tiosulfato de Sodio $3 \times 10^{-4}$ M (corregido).....	57
Tabla 12. Datos obtenidos en mg de la valoración del estándar de Acido Ascórbico de concentración conocida (400mg) mediante el método a Macroescala.....	58
Tabla 13. Datos obtenidos en la valoración a Microescala de la muestra de jugo patrón Sunny Delight tomada como referencia.....	58
Tabla 14. Resultados del ensayo a Microescala del jugo de naranja TAMPICO®.....	59
Tabla 15. Resultados obtenidos del análisis oficial con 2,6-Dicloroindofenol.....	59
Tabla 16. Comparación en los resultados obtenidos para el análisis del jugo de naranja marca “TAMPICO”®, utilizando los métodos 2,6-DCFIF a macroescala y yodométrico a microescala.....	60
Tabla 17. Resultados obtenidos en la determinación de la incerteza en la medida para los métodos de análisis utilizados (Yodometrico a Microescala, Yodimetrico a Macorescala y valoración a Macroescala con el reactivo 2,6-DCFIF).....	61
Tabla 18. Resumen de los resultados de las titulaciones a microescala de 4 marcas de jugos de naranja reportados como enriquecidos con vitamina C, jugo no enriquecido y estándar de vitamina “C” .....	62

## I. INTRODUCCIÓN

A través de los años, la evolución de los métodos de análisis empleados en la determinación de sustancias químicas ha ido proporcionando al analista profesional herramientas cada vez más versátiles, más precisas y más rápidas a fin de permitir la reducción del tiempo invertido en cada análisis y efectuar un mayor número de cuantificaciones por intervalo de tiempo; sin embargo en la mayoría de los casos esta reducción de tiempo tiene su precio y muy pocos analistas pueden costearlo dado a que se requiere de equipos sofisticados con reactivos especiales y un mantenimiento constante que a la larga le incrementan el costo a cada análisis en un porcentaje considerable. Ese es el caso de los análisis para determinación de Vitamina C. Los métodos de análisis han presentado una serie de cambios en los cuales han sido utilizadas metodologías de análisis de naturaleza variada y con equipos o aparatos diversos, por ejemplo: Métodos cromatográficos, volumétricos, microbiológicos y hasta espectrofotométricos entre otros, los cuales presentan una variación en el costo de implementación de cada uno de ellos muy considerable.

Un estudio cuali - cuantitativo tanto de las vitaminas como de cualquier otro componente de importancia dentro de un preparado es de vital interés para garantizar la seguridad a los consumidores, razón por la cual ningún productor puede darse el lujo de obviarlo de su proceso de manufactura, pero sí pueden optar por aquel método que siendo oficial le resulte viable o factible dependiendo de los recursos de su empresa. Afortunadamente hoy en día se cuenta con una nueva alternativa de análisis que promete

minimizar costos en los ensayos químicos, y los problemas de desechos normalmente asociados con la experimentación química: La Química a Microescala<sup>1</sup>.

Con esta nueva alternativa de análisis a microescala se cuenta ya con una herramienta que resulta efectiva, para que los organismos reguladores del aseguramiento de la calidad en alimentos a nivel nacional, específicamente en jugos procesados y naturales opten por utilizarla en sus protocolos de análisis, en las inspecciones a productos que deben ser registrados dentro del país, ya que en la actualidad las exigencias para alimentos que ingresan al comercio nacional no son muy estrictas ni precisas; como sucede en el caso de los Jugos de Naranja procesados que declaren enriquecimiento con Vitamina “C”, de los cuales a nivel de supermercados nacionales, muy pocos poseen una tabla de contenido declarando las cantidades del aditivo alimentario respectivo (siendo estos productos de origen extranjero). Dentro de los requisitos exigidos por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social para el registro de dichos productos no se contempla un análisis cuantitativo de ácido ascórbico o Vitamina C ni como aditivo alimenticio ni como antioxidante<sup>2</sup>.

Para aquellas industrias alimenticias que incluyen en sus procesos la producción de jugos de naranja enriquecidos con vitamina C y cuyos controles de calidad se basan en un Análisis de riesgos y de puntos críticos de control o Hazard Analysis and Critical Control Points (H.A.C.C.P, por sus siglas en inglés); la química a microescala resulta una herramienta viable y una buena opción para el análisis de la Vitamina C dado que

---

<sup>1</sup> About Micro-Scale Chemistry. Learning Resources Unlimits Inc. (CSMATE)

<sup>2</sup> Tesis de CÁCERES CHIQUILLOS- LÓPEZ TORRES.



H.A.C.C.P. requiere de eficiencia y optimización del tiempo, así como de confiabilidad de los métodos auxiliares de análisis (cuali – cuantitativos) que permita la toma de decisiones dentro de los puntos críticos del proceso de manufactura, siendo compatible con los objetivos que busca la química a microescala.

En la actualidad este tipo de métodos está siendo utilizado ampliamente alrededor del mundo brindando cambios notorios en la economía y la seguridad dentro de la entidad que los emplea, así como manteniendo la confiabilidad de los resultados obtenidos con ellos, por lo que convendría al país implementarlos por todos los beneficios que estos ofrecen.

## II. JUSTIFICACIÓN

La importancia de la vitamina C o ácido ascórbico fue descubierta en 1535 y su molécula fue identificada en 1932; desde esa fecha para acá el ácido ascórbico ha sido de vital importancia para el buen funcionamiento del organismo en procesos como la síntesis de colágeno, el metabolismo microsómico de fármacos y la absorción de hierro entre otros. Los seres humanos son incapaces de sintetizar ácido ascórbico y dada la importancia de este en muchas reacciones celulares es menester la ingesta adecuada pudiéndose obtener de una forma natural al consumir todo tipo de frutas cítricas o en su defecto al ingerir alimentos que se declaren enriquecidos con esta vitamina como es el caso del jugo de naranja procesado. A nivel industrial, sus usos han sido variados llegándose a emplear como enriquecedor de alimentos o como preservante (antioxidante). La importancia de la ingesta adecuada de esta vitamina radica en que si se consume de manera natural no se corre riesgo de sobre dosificación ya que las proporciones de ingestión son reguladas de forma natural; caso contrario cuando se administra como un aditivo en alimentos enriquecidos se puede llegar a tener una sobre dosificación o megadosis que conllevaría a formación de cálculos renales por excreción excesiva de oxalato, problemas a nivel óseo, e incluso escorbuto de rebote y un fenómeno similar cuando se consumen dosis elevadas de Vitamina “C” y se deja de consumir de manera repentina<sup>3</sup>. De aquí, entonces se ve la necesidad de que exista un control adecuado para regular el aporte justo de ácido ascórbico en la ingestión de jugos de naranja procesados, para garantizar a los consumidores un producto realmente enriquecido y apto para el consumo humano.

---

<sup>3</sup> Goodman & Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Pág. 1672.

Por lo tanto es determinante para que la industria pueda ser competitiva el mejorar la calidad de los productos y reducir los costos de los mismos. El problema mayor es que muchos pequeños empresarios no poseen el capital necesario para implementar un adecuado control de calidad de los productos elaborados por ellos así como de la materia prima que adquieren de diversos proveedores, y comprobar si ésta cumple con las especificaciones que requiere su proceso; ya que los análisis que se practican a la mayoría de preparados son de costos elevados y representan un incremento excesivo en el precio para el consumidor final debido a lo costoso que resulta llevar a cabo un buen análisis cuali-cuantitativo, que permita determinar si el producto elaborado contiene sus componentes en las proporciones adecuadas y si éstos van sin adulteraciones. Por otro lado nos encontramos frente a una deficiencia a nivel nacional de instituciones ya sean estatales o privadas que se dediquen a realizar un control de calidad de los productos alimenticios que circulan dentro del mercado nacional pese a que esto pueda significar un alto riesgo para la salud de la población.

Tanto el Estado a través de sus instituciones correspondientes como la industria de productos alimenticios salvadoreña deben asumir su papel de vigilar y producir alimentos de buena calidad y como consecuencia lograr mayor competitividad frente a industrias extranjeras, tanto dentro como fuera del país. El ácido ascórbico o vitamina C, en general una sustancia de mucha importancia alimenticia que actualmente se utiliza para enriquecer muchos alimentos, requiere de un control más minucioso a fin de evitar que se utilice inadecuadamente, y de evaluar el contenido correcto de la sustancia en productos presuntamente “enriquecidos”.

Con el presente trabajo de graduación se pretende crear y analizar un perfil comparativo de dos diferentes métodos de análisis del ácido ascórbico o vitamina C: **Titulación**

**yodimétrica a Macroescala y yodometría a microescala**, para demostrar que el método a microescala es una alternativa viable, tanto económica como práctica a la que las industrias alimenticias salvadoreñas que elaboran jugos de naranja pueden optar con el fin de realizar un control de calidad de menor costo, en menos tiempo, menos equipo de trabajo, reactivos, menos riesgo de contaminación ambiental como es el caso de la valoración con 2,6-DCFIF, el cual es un método oficial<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> VINAY KUMAR, "Quantitative Microscale Determination of Vitamin C", Journal of Chemical Education, volum 69, Number 8, Agosto 1992.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo General.

Realizar un estudio comparativo de la cuantificación de Vitamina C utilizando el método de titulación yodométrica a microescala y la titulación yodimétrica a macroescala.

#### 2. Objetivos Específicos.

2.1. Cuantificar ácido ascórbico (Vitamina C) en jugos de naranja de concentración conocida utilizando el método de titulación yodométrica a microescala.

2.2. Cuantificar ácido ascórbico (Vitamina C) en jugos de naranja de concentración conocida utilizando el método de titulación yodimétrica a macroescala.

2.3. Evaluar los métodos de análisis químico a microescala y a macroescala en la cuantificación de ácido ascórbico (Vitamina C).

2.4. Determinar los valores de incerteza y precisión de cada uno de los métodos utilizados para la cuantificación de Vitamina C.

2.5. Comparar los parámetros de tiempo, costo y versatilidad en cada uno de los métodos utilizados.

2.6. Cuantificar los contenidos de Vitamina C en jugos de naranja procesados y comercializados en El Salvador por el método yodométrico en microescala.



**©2004, DERECHOS RESERVADOS**

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

**<http://virtual.ues.edu.sv/>**

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**CAPITULO I**  
**MARCO TEORICO**

## 1.0. MARCO TEORICO

### 1.1. Orígenes de la química a microescala.

Los orígenes del concepto de química a microescala pueden haber sido iniciados por Fritz Pregl, un Austriaco quien ganó el premio Nobel en 1923 por haber desarrollado técnicas micro analíticas en química orgánica.

El primer intento por introducir la química a microescala a nivel de educación superior se dio en la década de los 40's por parte de Nicholas D. Cheronis de la Universidad de Chicago, sin embargo no lo consiguió debido a que para esa época no se divisaba problema alguno con la contaminación ambiental y tanto los reactivos como la cristalería resultaban económicos.

La primer fecha en donde se reporta la experimentación utilizando técnicas a microescala es en 1957 en Ámsterdam, Holanda; donde Arthur I. Vogel asevera en su libro llamado *small scale preparations* que, “estudiantes con cierto grado de conocimiento podrían ser capaces de llevar a cabo algunos experimentos a escala reducida”<sup>5</sup>.

El trabajo de este científico fue más allá de lo puramente experimental, ya que en su tratado cita algunas de las ventajas obtenidas de la experimentación a escala reducida. En la lista de Vogel refleja algunos de los motivos por los cuales se debería implementar la química a microescala y hace notar que su ejecución se fundamenta en consideraciones ambientales, económicas y de seguridad.

El concepto de Química a microescala propiamente dicho nace en 1980 en un pequeño pueblo de Nueva Inglaterra llamado “Bowdoin” acreditándoseles la iniciación de este

---

<sup>5</sup> Experimentación a microescala (Microschaalexperimenten). AMSTEL Institute, Amsterdam 1998.



concepto en los Estados Unidos, a los profesores Dana Mayo y Samuel Butcher, ambos maestros de la Universidad de Bowdoin junto a Ronald Pike del Merrimack College<sup>6</sup>. Por otro lado, existen otros pioneros del movimiento en diversas partes del mundo como por ejemplo el Doctor Hubert Aleya de la Universidad de Princeton, el Dr. Stephen Thompson, profesor de química de la Universidad del Estado de Colorado y los doctores Szafran, John Skinner y Stephen Breuer, quienes han sido a su vez iniciadores de esta modalidad innovadora de trabajo en sus laboratorios de experimentación<sup>7</sup> en los Estados Unidos y en otros países.

La química a microescala es altamente aceptada y practicada tanto a nivel educativo como industrial volviéndose cada día más extensas y prácticas sus aplicaciones y técnicas a tal grado de haber sido nombradas como “amigables para el ambiente” siendo totalmente compatible con una nueva tendencia filosófica en el área química llamada “la filosofía verde”. Esta lleva implícita la utilización de químicos y el desarrollo de procesos de experimentación que poseen poco o ningún potencial contaminante, reduciendo los riesgos para las personas y el ambiente mismo. La química a microescala, al igual que esta filosofía, apoya la manipulación de cantidades pequeñas de sustancias de naturaleza altamente tóxica, y describe procesos de neutralización para las mismas.

---

<sup>6</sup> Rebeca Andrews, Microscale Chemistry a wee revolution in college chemistry labs, nov. 26 1990.

<sup>7</sup> Learning Resources Unlimited Inc. ; microscale chemistry, The Royal society of Chemistry.

De esta manera científicos que estudian esta modalidad de hacer química han concluido que la química a microescala es apta y viable para realizar casi cualquier tipo de análisis ya sea físico, químico o fisicoquímico<sup>8</sup>.

Muchas de las investigaciones sobre la química a microescala han culminado con la publicación de libros sobre este tópico, las cuales señalan técnicas de manejo de instrumentación y de análisis que son factibles tanto a nivel de un laboratorio Industrial como en las Instituciones Educativas.

### **1.2. Teoría sobre la filosofía de “la Química verde”**

La importancia de conocer una nueva opción de trabajo no sólo se debe enfocar al conocimiento de las nuevas técnicas de análisis y de los métodos de cálculo estadístico para estos. Muchos científicos antes de iniciar un nuevo estudio o práctica optan por conocer las posibles consecuencias para el medio ambiente y la humanidad. En este sentido es menester, para todos los interesados en practicar esta nueva tendencia de hacer química, conocer los principios que rigen estas técnicas amigables para el medio ambiente y que en definitiva son las premisas para iniciar un anteproyecto de estudio químico en una determinada área de las ciencias químicas. Más adelante se presentan los fundamentos que rigen a la química a microescala (por ser esta amigable para el ambiente) para que de todo esto se busquen los principios de hacer estudios químicos que mejor se ajusten a la realidad salvadoreña.

Muchos químicos preocupados por el futuro de nuestro planeta y de nuestra propia raza se preguntan sobre cómo se podrá educar exitosamente a las nuevas generaciones

---

<sup>8</sup> Arde Zipp. Profesor distinguido de la U.N.Y. (Microscale: A Wee Revolution In College Chemistry Labs)

de químicos de tal manera que sean capaces de obtener las habilidades y el conocimiento necesario para practicar un estilo benigno de química tanto para la salud humana y en general para el medioambiente. Esta interrogante descansa en el corazón de la filosofía de la química verde.

En los Estados Unidos, la primera ley que se conoce al respecto es la denominada “*Acta de la prevención de la contaminación ambiental de 1990*”, que fue el primer acta que se enfocaba en la prevención de la formación de contaminantes. Esta acta alienta a las Industrias y Academias a divisar nuevas tecnologías y procesos que eviten la formación y / o el uso de sustancias peligrosas. En el campo de la química, ésta ha inspirado a muchos químicos a reemplazar, por ejemplo, un solvente orgánico por agua o a eliminar un solvente por completo y a diseñar nuevos compuestos que son menos tóxicos pero que tienen las mismas propiedades deseadas que las de un compuesto ya existente.

Seguido de esta acta, se han decretado más de cien leyes ambientales. En 1998 la Sociedad Americana de Química (ACS, según sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA, según sus siglas en inglés) de los Estados Unidos iniciaron los proyectos de desarrollo de materiales educativos con relación a esta nueva modalidad de trabajo. De aquí en adelante, los fundamentos y principios de trabajo de la química verde se fueron consolidando y estructurando a tal grado de llegar a tener mayor peso legal en los Estados Unidos. Esta tendencia filosófica se fundamenta en la implementación de nuevos métodos y técnicas para minimizar el

---

<sup>9</sup> Cann, M.C.; and Connelly, M.E. *Real World Cases in Green Chemistry*, American Chemical Society: Washington, DC, 2000

gasto y el desecho de productos químicos que poseen un alto potencial para incrementar el índice de contaminación ambiental.

### **1.3. ¿Qué es la “Química verde”?**

La “química verde” es la utilización de una serie de principios que eliminan o reducen una generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de productos químicos.

Para la Real Sociedad de Química (RSC, por sus siglas en inglés), la química verde se define como “el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y la generación de sustancias peligrosas”.

### **1.4. Principios de la Química verde.**

Según Cann, M.C.; and Connelly, M.E., en su libro titulado “Casos Reales a Nivel Mundial en la Química Verde” (Real World cases in Green Chemistry), La filosofía de la química verde se fundamenta sobre la base de doce principios<sup>10</sup> esenciales, desarrollados por Anastas y Warner. Estos principios pueden servir como una guía para la práctica química en el desarrollo y la determinación de cuan dañino o no es para el ambiente una síntesis, un compuesto, un proceso o una tecnología.

1. Prevención.
2. Economía del átomo.
3. Menos número de síntesis químicas peligrosas.
4. Diseño de químicos más seguros.

---

<sup>10</sup> *Green Chemistry: Theory and Practice*. P. T Anastas y J. C., Warner, Oxford University Press, Oxford, 1998, p.30.

5. Solventes y auxiliares más seguros.
6. Diseño para una energía eficiente.
7. Reutilización de materia prima.
8. Reducción de derivados.
9. Catálisis.
10. Diseño para la degradación.
11. Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación.
12. Química inherentemente más segura.

No todos los principios son aplicables en algunos países, máxime cuando estos no tienen la tecnología para adoptarlos. Caso de El Salvador, cuyo proceso de desarrollo le impide por el momento llevar a cabo estudios de economía del átomo, por ejemplo, ya que esto implica desarrollar moléculas menos dañinas y de mas eficiencia en los procesos de elaboración de productos más amigables para el ambiente.

La filosofía de la química verde enfoca sus esfuerzos en concientizar , culturizar y ayudar a todas las entidades o personas involucradas en la producción, utilización, neutralización y deposición de sustancias químicas que generan una descarga negativa para el medioambiente en general. Este enfoque impulsa a los científicos a investigar nuevos métodos y técnicas para un uso racional y seguro de las sustancias químicas.

Algunos de los aspectos que la filosofía de la química verde tiene a bien proponer a los científicos, investigadores, analistas o estudiantes son<sup>11</sup>:

1. La búsqueda de síntesis más limpias. (ejemplo, nuevas rutas de síntesis para intermediarios químicos importantes, incluyendo los heterociclos).
2. El mejorar la utilización de átomos (ejemplo, descubrir métodos más eficientes de bromación).
3. El reemplazo de reactivos estequiométricos (ejemplo, oxidaciones catalíticas utilizando el aire como única fuente consumible de oxígeno).
4. Implementación de procesos y productos a base de agua (ejemplo, reacciones orgánicas en agua a altas temperaturas).
5. El reemplazo de reactivos peligrosos (ejemplo, la utilización de ácidos sólidos como substitutos de los ácidos corrosivos tradicionales).
6. La alternativa de utilizar reactivos naturales (ejemplo, el uso de productos derivados de las plantas como materia prima para la industria química).
7. La elaboración de materiales y químicos más seguros (ejemplo, nuevos pesticidas derivados de productos naturales).

---

<sup>11</sup> <http://www.chemsoc.com>. Editorial - 1st issue 1999 by James Clark, York, January 1999.

8. La minimización y reducción de la cantidad de desechos (ejemplo, la aplicación de los principios de utilización del átomo y el uso de catálisis selectiva).

En esencia, se puede afirmar que :

1. La química verde representa un cambio fundamental alejado de los viejos modelos de ejecución y control y encaminado al paradigma de la prevención de la contaminación en el cual se adapta perfectamente la utilización de técnicas a microescala.
2. La química verde es ambientalmente benigna, uniendo el diseño de productos y procesos químicos con sus impactos en la salud humana y el medio ambiente.
3. La química a microescala por sus métodos y técnicas enfocadas a la armonización de los factores ambientales y de salud humana, se ajusta perfectamente a las exigencias que esta tendencia filosófica de las ciencias químicas ha establecido.
4. La química a microescala es segura:  
No hay reactivos o procedimientos peligrosos.  
La concentración de las soluciones está en el orden de  $1 \times 10^{-5}$  y 0.1 M. Estas nunca exceden de 0.1 M.

Las pipetas de plástico son utilizadas como reservorios del reactivo, las cuales sólo descargan aproximadamente 20 microlitros de solución diluida.

5. La química a microescala proporciona resultados en un tiempo eficiente:

La elaboración de los experimentos se hace fácil para el analista.

Los resultados de los experimentos son obvios e inmediatos.

Es necesario aclarar que el término “microescala” no sólo involucra reducción de cantidades de reactivo y muestra; sino que involucra también mayor eficiencia y aprovechamiento de los recursos como tiempo, reactivos, humano, instrumentales, entre otros.

Este nuevo concepto requiere de un rango pre establecido de concentración en las soluciones involucradas en el análisis característico de él, el cual oscila entre  $1 \times 10^{-5}$  y 0.1 Molar; siendo este rango uno de los puntos críticos que determina los resultados finales obtenidos. Así mismo la técnica a microescala requiere de una adecuada manipulación de los instrumentos y mucha atención por parte del analista o experimentador; a fin de evitar resultados falsos (positivos o negativos) puesto que estos son casi inmediatos.

A nivel de instituciones educativas en los Estados Unidos y parte de Europa, la química a microescala está teniendo mucho auge por sus características, ventajas y beneficios; a tal grado de que en muchos estados de la Unión Americana se han regulado leyes ambientales que sugieren el uso de esta técnica para evitar el aumento drástico de la contaminación ambiental debido a desechos tóxicos.<sup>12</sup> Existe una gran

---

<sup>12</sup> Microscale Chemistry in undergraduate teaching laboratories (40 CFR parts 260-268 State of Michigan Act 451 part III)



cantidad de instituciones dedicadas al estudio e investigación de esta nueva técnica de análisis químico que involucra pequeñas cantidades de reactivos y muestra para llevar a cabo pruebas y ensayos cuali – cuantitativos; muchas de las cuales exponen los motivos para su implementación en laboratorios a nivel educativo y de la industria en general.

### **1.5. Definiciones de Química a microescala.**

El Midwest Research Institute (MRI), división de Florida, en su artículo publicado en la revista *micro-scale chem Gazette* Volume I, Issue 1; define a la química a microescala como “un método ambiental, seguro para la prevención de la contaminación a través de la ejecución de procesos químicos utilizando pequeñas cantidades de reactivos sin comprometer la calidad y estándares de las aplicaciones químicas a nivel educativo e industrial”.

También, la química a Microescala se define como un método de análisis que utiliza cantidades de material químico, reducidas al nivel mínimo en el que un experimento dado puede llevarse a cabo<sup>13</sup>.

El Doctor Hubert Aleya de la Universidad de Princeton define la química a microescala como “procesos simples para la conducción de la experimentación química a una escala mucho más pequeña que lo cotidiano”. Las técnicas de análisis a micro escala usan diminutas cantidades de reactivos químicos para llevar a cabo los mismos experimentos que los de un laboratorio a macroescala logrando el mismo

---

<sup>13</sup> what is microscale chemistry?. <http://www.silvertech.com/microscale/>

nivel de aprendizaje y resultados. El doctor Aleya enfatiza que, “esta gran reducción de escala requiere de técnicas, equipo y de instrucciones modificadas”.

Los profesores de química de la Universidad de Bowdoin en Brunswick, Maine, manejan el concepto de que química a microescala “es un método de prevención de la contaminación ambiental, que disminuye la cantidad del desecho químico generado durante los experimentos de laboratorio”.

La química a microescala se caracteriza por la utilización de cantidades drásticamente reducidas de químicos, por poseer técnicas seguras y de fácil manipulación, y por requerir equipo y cristalería en miniatura así como el de poseer habilidades de alta calidad.

La química a microescala es un acercamiento innovativo, digital, amistoso para el usuario, transparente, cuantitativo y de gran facilidad de observación que une tanto al estudiante como al analista en la química experimental. Esta proporciona una solución para la mayoría de los problemas asociados con la instrucción en el laboratorio.

Esta técnica es el resultado de más de treinta años de investigación y prueba; y ha sido utilizada durante 15 años en los programas del primer año de química en muchas Universidades de los Estados Unidos como La Universidad del Estado de Colorado, Universidad del Estado de Pennsylvania y la Universidad del Estado de Oregon.

La química a microescala involucra la utilización de métodos no tradicionales, aparatos y técnicas que han sido revelados en microbiología, biología molecular, y en la investigación de nano tecnología. La realidad de esta investigación ha sido la de obtener y analizar la máxima cantidad de información, de la manera más simple posible, al más bajo costo y con mayor seguridad de operación.

### **1.6. Beneficios de la química a micro escala :**

1. La reducción en la utilización de reactivos químicos.
2. La cantidad de desechos producidos se reduce considerablemente.
3. Vuelve más fácil el reciclaje (hay menos material para ser reciclado).
4. Reduce la exposición del analista a los químicos peligrosos.
5. Elimina virtualmente los peligros de incendios o explosiones.
6. Mejora la calidad del aire en el laboratorio de experimentación.
7. Reduce la cantidad de derrames y accidentes.
8. Baja considerablemente los costos de laboratorio.
9. Requiere menor tiempo de experimentación.
10. Enseña excelentes técnicas de laboratorio.
11. Disminuye los costos por cristalería quebrada.
12. Ahorra espacio de almacenamiento.
13. Mejora las habilidades de laboratorio de los estudiantes o el analista.
14. Provee de un ambiente limpio y productivo.
15. Esta íntimamente relacionado con los principios de la “Química Verde”.
16. Ayuda a concientizar a los estudiantes sobre las virtudes de los químicos y su impacto en el medio ambiente.
17. Hace posible que el laboratorio de experimentación sea más práctico de utilizar para personas con discapacidad física.

### **1.7. Fundamentos de la Química a Microescala.**

Según el Instituto de investigación de Medio Oeste (MRI, por sus siglas en inglés) los fundamentos esenciales de la química a microescala son:

1. Una reducción de reactivos químicos a volúmenes y masas cien veces más pequeña que las usadas en los laboratorios tradicionales.
2. Un cambio en la utilización de la cristalería común a los materiales plásticos o polímeros modernos en los instrumentos para la transferencia, almacenamiento y reacción.
3. La utilización de herramientas de observación para múltiples muestras lo que permite una rápida preparación intuitiva, comparación y variación de sistemas químicos en todas sus fases: gases, líquidos y sólidos.
4. La química a microescala utiliza equipo de bajo costo, de fácil obtención como mondadientes, pajillas, pipetas plásticas y platos de micro reacción para realizar experimentos químicos sofisticados que tradicionalmente requieren cristalería, reactivos e instrumentación costosa.

Este nuevo acercamiento a la química promueve la prevención de la contaminación ambiental, la minimización de los residuos tóxicos y la seguridad a través de la disminución de la exposición a los derrames químicos y desechos peligrosos.

### **1.8. Microtitulaciones:**

Dentro del amplio campo de la química a microescala, existe espacio suficiente como para llevar a cabo las mismas actividades que se realizan a macroescala, obteniendo resultados iguales o aun mejores que en ésta. Así, se ha determinado que gracias a la química a microescala, se han llegado a realizar cuantificaciones de compuestos mediante microtitulaciones, en tiempos sorprendentemente cortos y obteniendo resultados fidedignos y precisos.

Se conoce de antemano que una titulación es un método en el cual se observa una reacción química para determinar la cuantificación exacta de cada reactante involucrado en dicha reacción. En un análisis mediante titulación, una cantidad conocida de la solución de una sustancia “X” es adicionada continuamente hacia una solución “Y” hasta que la reacción alcanza su punto final. En algunas ocasiones es necesaria la utilización de sustancias indicadoras para visualizar dicho punto final. Este concepto es igual en ambas metodologías (macro y microescala), la diferencia radica en las proporciones utilizadas de ambas soluciones.

Las titulaciones a macroescala se han ido reemplazando por técnicas a microescala tanto a nivel de educación como a nivel industrial en los países desarrollados e industrializados dentro de los cuales, dicho sea de paso, se llevan controles de calidad estrictos y seguros y por lo tanto es necesario que los analistas salgan lo suficientemente capacitados desde su educación profesional, conociendo las nuevas técnicas de análisis.

Un buen control de calidad es vital para que un producto sea competitivo y confiable a la vez, máxime si se trata de un producto alimenticio en el cual todos sus componentes deberían ser cuidadosamente analizados a fin de garantizar su inocuidad en el

producto final; ya que es conocido que ciertos componentes dentro de los alimentos son requeridos para una buena salud, por ejemplo los nutrientes como las proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Por esta razón es que muchos productos se presentan hoy en día como “enriquecidos” en una mezcla compleja de componentes; entonces ¿Cómo es que los investigadores han analizado los alimentos para determinar estos diferentes componentes?. Ciertamente, las técnicas de titulación dan una primera respuesta a esta interrogante ya que existen métodos de cuantificación específicos para determinar la presencia o no de cada uno de estos compuestos en un producto alimenticio determinado inclusive en presencia uno de otro sin presentar mayor interferencia. Los fundamentos de las reacciones en las titulaciones a microescala son los mismos que los de las de macroescala y dependen del tipo de reacción que se verifique y de la naturaleza del componente a titular. Así por ejemplo, si lo que se desea titular es un acidificante se verifica una reacción ácido - base por lo que el fundamento de tal reacción es la formación de una sal mediante la adición de un álcali en presencia de un indicador específico que presente un viraje de color según el cambio de pH<sup>14</sup>.

Una de las ventajas de utilizar las técnicas a microescala es que se puede cuantificar la cantidad de una sustancia específica dentro de un producto pese a que dicha sustancia se encuentre en pequeñas proporciones como en el caso de la vitamina C cuando esta actúa como antioxidante y no como nutriente de enriquecimiento para los productos; o bien puede ayudarnos a determinar (en este caso en particular) si dicha sustancia esta

---

<sup>14</sup> Daniel C. Harris; Quantitative Chemical Analysis. Cuarta edición. Michelson Laboratory China Lake, California W.H. Freeman & company, New York 1995.

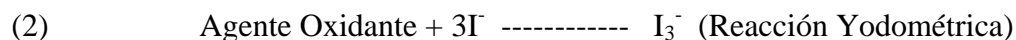
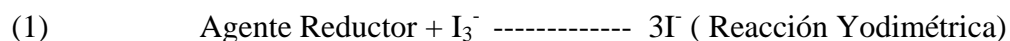
actuando como antioxidante pese a que sea declarada como aditivo nutricional en un producto, verificando mediante la microtitulación si la proporción de dicha vitamina es la adecuada como para cubrir una ingesta diaria recomendada (RDA por sus siglas en inglés). La importancia de poder emplear estas técnicas de análisis a microescala para ésta determinación de ácido ascórbico radica en las funciones de la Vitamina C en el organismo.

### **1.9. Titulaciones a Macroescala**

La cuantificación de sustancias en solución mediante macrotitulaciones ha sido una técnica ampliamente utilizada en el campo del análisis cuantitativo ya sea para fines investigativos o para fines de control de calidad, siendo sus resultados muy confiables y precisos; sin embargo la técnica posee la desventaja de consumir gran cantidad de reactivo así como tiempo, aparte de presentar algunas interferencias que afectan grandemente al análisis en cuanto al punto final.

En las titulaciones yodométricas, en general, se debe utilizar un indicador para el yodo que, ayude a detectar el punto final de la titulación. En la yodimetría (titulación con  $I_3^-$ ), el almidón se puede agregar al inicio de la titulación. La primera gota de exceso de  $I_3^-$  antes de alcanzar el punto de equivalencia ocasiona que la solución se torne de color azul negro. En yodometría (titulación del exceso del ión  $I_3^-$ ), el ion  $I_3^-$  está presente a lo largo de la reacción hasta la detección del punto de equivalencia. El almidón no deberá ser agregado a dicha reacción hasta inmediatamente después del punto de equivalencia; de lo contrario, algo de yodo tenderá a permanecer enlazado a las partículas del almidón después de alcanzado el punto de equivalencia.

En consecuencia, los agentes reductores pueden ser titulados directamente con estándar de  $I_3^-$  (1) en presencia de almidón, hasta desarrollar el intenso color azul dado por el complejo almidón-yodo en el punto final. Un ejemplo de determinaciones yodimétricas es la que ha desarrollado en este trabajo de investigación con la cuantificación de la vitamina C. Los agentes oxidantes pueden ser tratados con un exceso de yoduro ( $I^-$ ) para producir  $I_3^-$  (2). El análisis yodométrico se completa titulando el  $I_3^-$  liberado con una solución estándar de Tiosulfato de Sodio. Aquí la solución indicadora de almidón no se adiciona hasta justo antes del punto final.



Por otra parte, el complejo almidón-yodo es dependiente de la temperatura. Así se conoce que a  $50^\circ\text{C}$ , el color del complejo desarrollado es solamente una décima parte de intenso con relación a lo que es a  $25^\circ\text{C}$ . Si se desea tener mayor sensibilidad en la intensidad de coloración del complejo, es recomendable enfriarlo con hielo.

### **1.10. Generalidades de la vitamina C.**

Una ingesta de ácido ascórbico es necesaria dado que la vitamina C es requerida diariamente por el hecho de no poder ser sintetizada endógenamente por el organismo humano y es vital para la respiración celular, para la función enzimática, por ser un componente en la formación de colágeno y últimamente se ha descubierto una participación importante de dicha vitamina en el proceso de absorción de hierro en el



cuerpo, todo esto sumado al hecho de ser la única vitamina que ayuda a la prevención y cura del escorbuto, razón por la cual fue introducida a las necesidades diarias de la población ya que se comprobó que solo 10 mg de ésta son necesarios para curar el escorbuto y 60 mg diarios ayudan a prevenirlo<sup>15</sup>. Al mismo tiempo, algunos estudios reportan una relación positiva entre el consumo de la Vitamina C y la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, estrés, mantiene saludables las venas, piel cartílagos y huesos<sup>16</sup>.

Si bien es cierto, existen mil fuentes de vitamina C en la naturaleza, también debe enfrentarse la realidad que hoy en día, las personas enfrentamos una cotidiana lucha contra el tiempo y se lleva una vida tan agitada que a muchos los obliga a volverse prácticos incluso en lo que a dieta y nutrición se refiere, al punto de optar por alimentos envasados y pre-elaborados o de “fácil preparación”, poniendo en un gran riesgo su salud. Esta misma razón hace que los productores de alimentos opten por elaborar productos “enriquecidos” con algunas de las sustancias más necesarias para el consumidor. Sin embargo no solo por el hecho de rotular un alimento que está “enriquecido” debe confiarse en él, es necesario comprobar dicho enriquecimiento y determinar si realmente el producto contiene lo que el productor le rotula; para este fin resulta muy efectiva la microtitulación.

### **1.11. Micro análisis de la Vitamina “C”.**

En el campo de la química a microescala se ha reportado varios métodos para la determinación de la vitamina C en diversos componentes o sustancias ya preparadas. Un método a microescala previamente reportado para la determinación de ácido

---

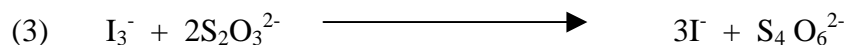
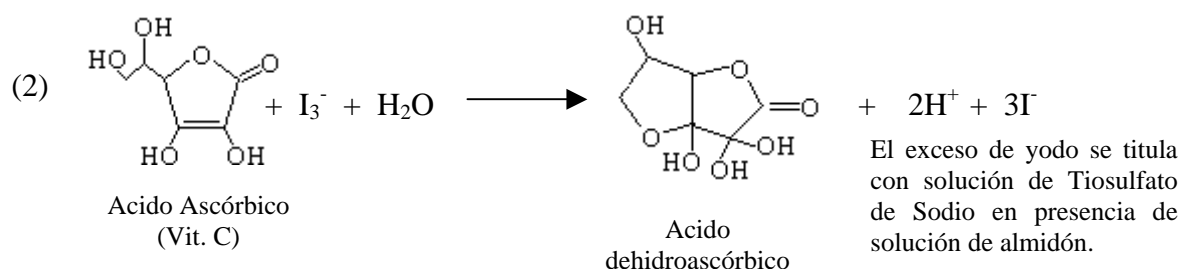
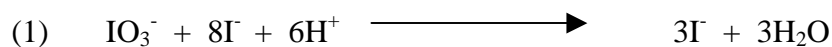
<sup>15</sup> Microanalysis of vitamin C in citrus juices. <http://servisea.juniata.edu/AscienceInMotion/chem./micro.htm>.

<sup>16</sup> Natural food-Fruit Vitamin C content. <http://www.naturalhub.com>,

ascórbico es el que utiliza el colorante 2,6-dicloroindofenol como indicador y titulante a la vez. Este método tiene el inconveniente que su punto final es retardado y difícil de discernir, el método no puede ser utilizado en muestras muy coloreadas y el 2,6-dicloroindofenol es reducido por las sales de  $\text{Fe}^{2+}$  que usualmente se encuentran presentes en las multivitaminas<sup>17</sup>, sin olvidar que de este reactivo no se conoce mucha información sobre su impacto en la salud y el medio ambiente.

El método yodométrico a microescala que se ha tomado como base para este trabajo de investigación es muy preciso, tiene un punto final muy definido y funciona muy bien con las muestras coloreadas; un exceso conocido de  $\text{I}_3^-$  es generado por la reacción entre el yodato y el yoduro el cual reacciona con el ácido ascórbico ( $\text{I}_3^-$ )

Según el journal of Chemical education vol 69, N° 8 de agosto 1992, las reacciones que se llevan a cabo en todo el proceso de la titulación a microescala son las siguientes:

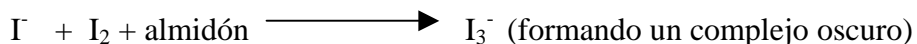
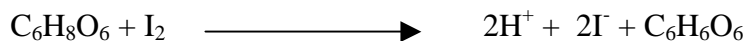


<sup>17</sup> Thompson, S. Chemtrek; allyn and Bacon: Boston, 1990; pag. 211

Según muchos catedráticos de universidades de los Estados Unidos y Europa, la respuesta esperada de este análisis es muy buena y confiable siempre y cuando se tomen en consideración factores que afectan el buen desarrollo del análisis; como lo son temperatura, luz, etc. Stephen Thompsom, Allyn and Bacon 1990, en su libro Chemtrek discuten dichos factores y concluyen que la determinación del punto final utilizando almidón como indicador, se vuelve engañoso con el paso del tiempo en los jugos de fruta; el color es estable con las soluciones de vitamina C. La cantidad de solución de Tiosulfato de sodio necesaria para alcanzar el punto final disminuye al analizar 8 muestras de un mismo jugo (Vit. C), sugiriendo que la vitamina C ha sido oxidada por el aire. También exponen, que en su práctica determinaron que el goteo de la solución titulante se controló mejor utilizando goteros en lugar de jeringas. No observó diferencia en el alcance del punto final al utilizar solución de almidón al 1% o solución de almidón para lavandería. La solución estándar de vitamina C deberá ser de preparación reciente y deberá refrigerarse. También, los jugos de muestra deben obtenerse uno o dos días antes del análisis y deberán guardarse en refrigeración de ser posible, a lo largo del análisis en el laboratorio, ya que la concentración de vitamina C cambiará significativamente durante el día si se almacena a temperatura ambiente.

### **1.12. Titulación Yodimétrica de Vitamina “C” a Macroescala.**

El método yodimétrico se fundamenta en la medición de vitamina C utilizando la manera a la cual la vitamina C puede ser oxidada (forzada a perder electrones) por el yodo. En las titulaciones yodimétricas la reacción que se produce entre la vitamina C es como sigue:



### 1.13. Comparación de las técnicas a Macro y Microescala<sup>18</sup>.

Con el fin de obtener parámetros teóricos de comparación con los datos obtenidos, se ha tomado en cuenta la siguiente información, proporcionada por el Departamento de Calidad Ambiental (MDEQ, por sus siglas en inglés) instalado en la Universidad de Michigan.

La universidad de Michigan en su afán de contribuir a evitar el aumento de la contaminación ambiental se dedicó a investigar por medio de un trabajo de campo en sus laboratorios las ventajas que ofrecen las técnicas a micro escala en términos de producción de desechos, gasto de reactivos, de costo y tiempo.

Los resultados que obtuvieron en su investigación reflejaron una economía en el uso de reactivos químicos en mas de un 99%, tabla 1. Lo cual es beneficioso para sus propósitos educativos ya que más alumnos podrían experimentar gracias a lo versátil y practico que resultaba utilizar poca cantidad de reactivos químicos.

También, se estudiaron los desechos generados por este tipo de practicas de laboratorio, ver tabla 2; demostrando que los desechos generados por semestre por las

---

<sup>18</sup> Departamento de Calidad Ambiental de Michigan, Delta College

técnicas a microescala tienen un diferencial de casi 178 L menos en comparación con las técnicas a macroescala.

Por ultimo, en el afán de comprobar si este método era factible en términos de tiempo y economía se realizo un estudio del tiempo en que un estudiante promedio se toma para preparar y ejecutar un análisis de laboratorio utilizando los dos métodos, tabla 3. Los resultados fueron que las técnicas a microescala tuvieron una ventaja de casi seis horas en comparación de las técnicas convencionales de análisis. Así mismo, el dinero invertido en los análisis a microescala es diez veces menor con relación al de macro escala, disminuyendo relativamente su costo conforme se realizan mas practicas ya que el precio por análisis se mantiene casi constante en microescala y en macroescala aumenta.

Tabla 1. Volumen de reactivos químicos requeridos para todos los experimentos realizados durante un semestre universitario.

<b>Macro / Tradicional</b>	<b>Micro / pequeña escala</b>
180 L	20 L
<b>Realizando el experimento utilizando la química a microescala se reduce la cantidad de reactivos químicos requeridos en más de un 99%.</b>	

Tabla 2. Volumen de desecho generado por categoría (Todos los desechos deberán ser tratados o depuestos apropiadamente).

Tipo de desecho generado	Desecho producido en el laboratorio en Litros (L)	
	Bajo Prácticas estándares	Bajo micro Química
Metales pesados	45	0.36
Venenos	60	0.50
Desechos básicos	22	0.19
Eutroficación	180	0.44
Químicos (Total)	300 – 350	1 - 2
<b>La Química a Microescala reduce los desechos generados en un 99.6%</b>		

Tabla 3. Comparación de costo y tiempo

Detalle	Macro	Vrs.	Micro
Tiempo de preparación y ejecución	10 horas		4 horas
Costo de materias primas y de preparación por 5 laboratorios	\$1,550.00		\$171.58
Costo de un experimento de laboratorio realizado	\$310.00		\$171.58
Costo de 52 experimentos de laboratorio.	\$15,500		\$171.58
<b>La Química a Microescala ahorra más del 60% de tiempo</b>			

**CAPITULO II**  
**METODOLOGIA**

## 2.0. METODOLOGÍA

### 2.1. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

Los ensayos que se llevaron a cabo para la comparación de los métodos son: el método Yodimétrico dictado para el análisis de ácido ascórbico materia prima por la Farmacopea de los Estados Unidos edición XX. La muestra utilizada para ambos métodos fue un estándar de vitamina "C", la cual contaba con un 99.86% de pureza.

La marcha analítica seguida fue:

#### 2.1.1. Metodología de Análisis de Acido Ascórbico materia prima por el Método Yodimétrico a Macroescala.

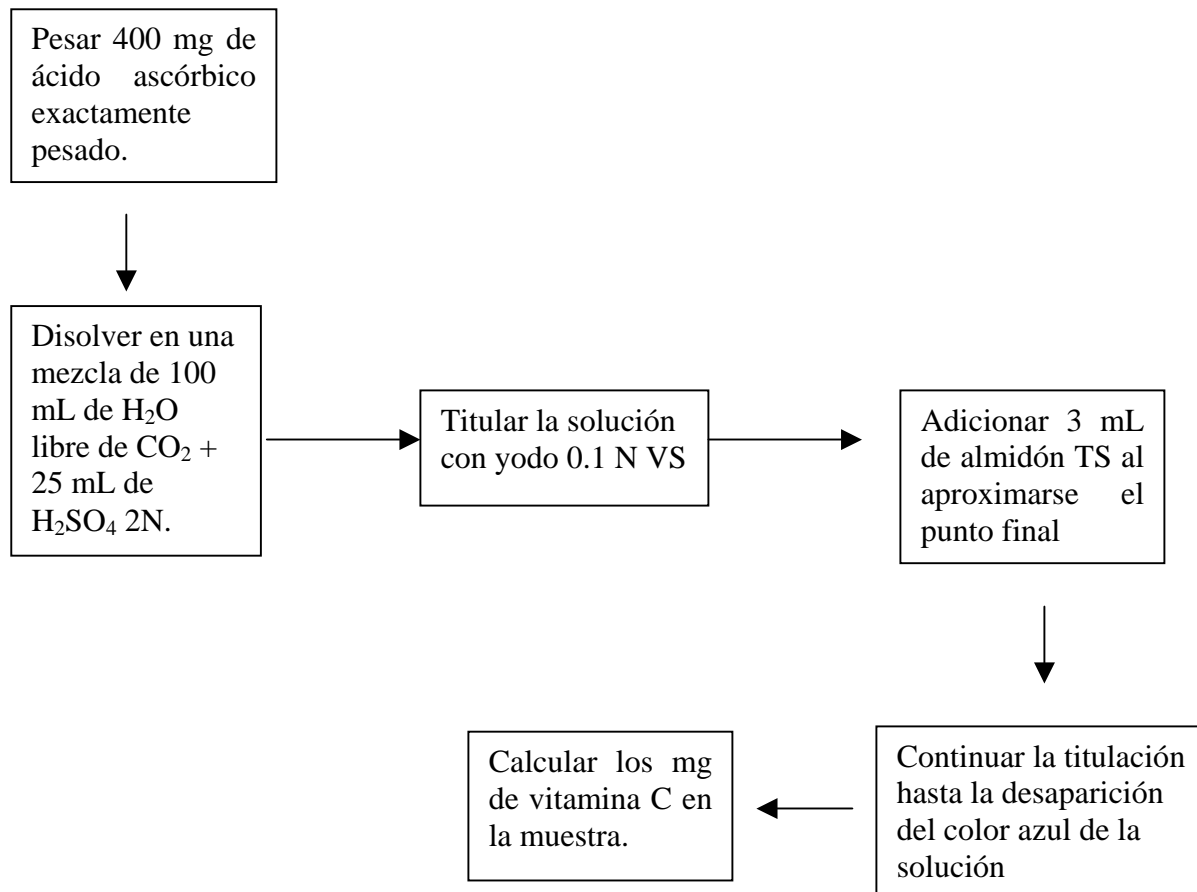
Pesar exactamente 400 mg de ácido ascórbico, disolver la muestra en un Erlenmeyer adicionando una mezcla de 100 mL de agua destilada libre de  $\text{CO}_2$  y 25 mL de Acido Sulfúrico 2 N. Adicionar 3 mL de solución de almidón TS y titular la solución con solución de Yodo 0.1 N solución VS. Cada mL de solución de Yodo 0.1 N, es equivalente a 8.806 mg de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ .

A continuación se esquematiza el procedimiento.



## 1) Marcha del Análisis a Macroescala de Vitamina "C" materia prima por el método

## Yodimétrico.

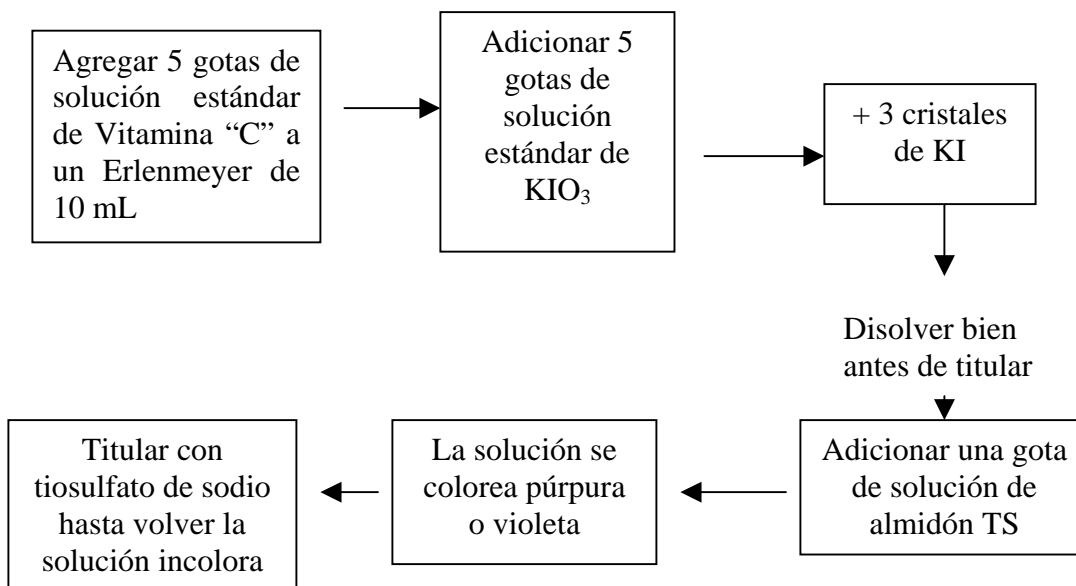


2.1.2. Metodología de análisis de solución estándar de concentración conocida de vitamina “C” con Tiosulfato de Sodio  $3.0 \times 10^{-4}$  M a Microescala.

Preparar un estándar de 1 mg/mL de vitamina “C”. Tomar 5 gotas de solución estándar de vitamina “C” y agregarlas a un Erlenmeyer pequeño. Adicionar, según el orden de aparición, 5 gotas de solución estándar de Yodato de Potasio, 3 cristales de Yoduro de Potasio. Disolver bien todos los cristales antes de iniciar la titulación con tiosulfato de sodio hasta un punto final incoloro o hasta obtener el color inicial de la muestra.

Así como se esquematiza:

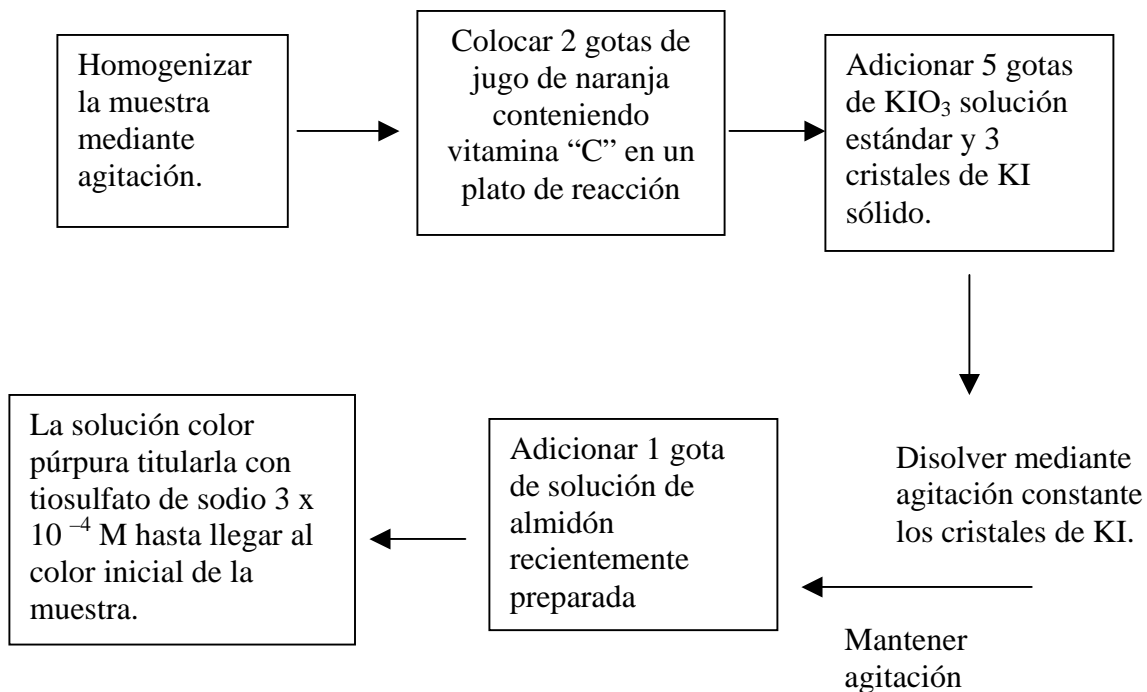
2) Marcha del Análisis a Microescala para solución estándar de concentración conocida de vitamina “C” utilizando Tiosulfato de Sodio como titulante.



2.1.3. Metodología de análisis a Microescala para la determinación de vitamina “C” en jugo de naranja con Tiosulfato de Sodio  $3 \times 10^{-4}$  M.

Para este ensayo no es necesario el tratamiento previo de la muestra. Tener el cuidado de agitar bien dicha muestra previo a la titulación. Transferir cuatro gotas de jugo de frutas (o dos gotas de jugo de naranja) dentro de un plato de reacción. Adicionar cinco gotas de solución estándar de  $\text{KIO}_3$ , en la muestra; y 3 cristales de KI. Disolver bien todos los cristales antes de continuar con la titulación con Tiosulfato de sodio. El punto final de esta titulación no es incoloro sino que de color similar al jugo de la muestra antes de su titulación.

3) Marcha del Análisis a microescala para la cuantificación de Vitamina “C” en jugo de naranja utilizando Tiosulfato de Sodio  $3 \times 10^{-4}$  M como titulante.



2.1.4. Metodología de análisis sugerido por AOAC utilizando 2,6-dicloroindofenol como titulante.

Para realizar el análisis de vitamina “C” en jugo de naranja se prepara un estándar de concentración conocida (100  $\mu\text{g}$  / mL), se titula una muestra homogénea de jugo de 16 mL y se corre un blanco compuesto de 7.0 mL de buffer solución de ácido metafosfórico- ácido acético.

2.1.4.1. Titulación del estándar: Transferir tres alícuotas de 2.0 mL de solución estándar de ácido ascórbico en cada uno de tres Erlenmeyers de 50 mL conteniendo cada uno 5.0 mL de solución de ácido metafosfórico-ácido acético. Titular rápidamente con solución de Indofenol utilizando una bureta de 50 mL hasta que un suave pero distintivo color rosa persista por lo menos durante 5 segundos (cada titulación debería requerir unos 15 mL de solución de Indofenol y las titulaciones se deberán revisar en intervalos de 0.1 mL)

2.1.4.2. Titulación de la muestra:

Titular 3 alícuotas de muestra, de la misma manera que se hizo en la titulación del estándar, conteniendo cada una aproximadamente 2 mg de ácido ascórbico y realizar determinaciones con tres blancos para realizar las correcciones pertinentes de cada titulación, utilizando volúmenes apropiados de solución de ácido metafosfórico-ácido acético y agua. Si la cantidad aproximada de 2 mg de ácido ascórbico esta contenida en una alícuota menor de 7 mL, agregar más solución de ácido metafosfórico-ácido acético necesaria para hacer los 7 mL de muestra para la titulación.

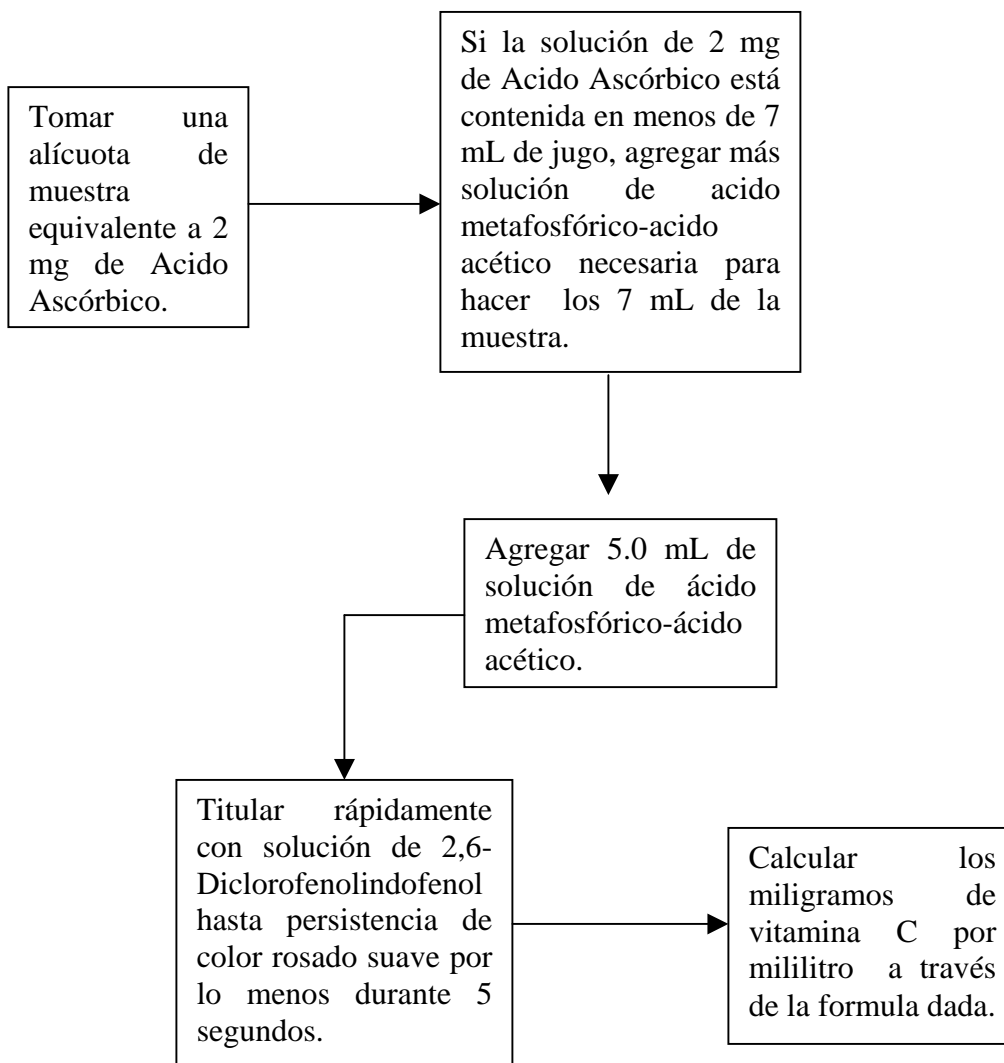
#### 2.1.4.3. Titulación de los blancos:

De la misma manera titular 3 blancos compuestos de 7.0 mL de solución de ácido metafosfórico-ácido acético más el volumen de agua igual al volumen de Indofenol gastado en la titulación directa. Antes de restar el volumen promedio de los blancos (usualmente 0.1 mL) de las titulaciones estándar, calcular y expresar la concentración de solución de Indofenol como miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 1.0 mL de reactivo. Estandarizar la solución diariamente con solución estándar de ácido ascórbico recientemente preparada.

A continuación se resume la marcha analítica para este método de análisis.

4) Marcha del Análisis Macroescala de Vitamina “C” en jugo de naranja por el método oficial utilizando el reactivo 2,6-Dicloroindofenol.

Titular un estándar de concentración conocida (100 ug/mL) y se corre un blanco compuesto de 7.0 mL de solución buffer de ácido metafosfórico- ácido acético siguiendo la misma marcha que para la muestra de jugo.



## 2.2. METODOLOGÍA DE CALCULOS

### 2.2.1. Cálculo de miligramos de vitamina “C” materia prima por el método Yodimétrico a Macroescala.

Para determinar la cantidad de Vitamina “C” materia prima analizada por este método, se utiliza un factor proporcionado por la USP XX el cual representa la equivalencia de ácido ascórbico presente por cada mL de yodo gastado. Así, que se multiplicará el volumen de solución de yodo (0.1N) gastado por 8.806 mg. (ver ejemplo de cálculos en anexo 4)

Así, tomando los datos de la siguiente tabla,:

Tabla 4. Valores obtenidos en gramos en la titulación de la solución estándar de Acido Ascórbico de concentración conocida (400mg) mediante el método a Macroescala

Ensayo N°	Peso real del St Vit. “C” (g)	Peso corregido según pureza de vitamina “C” <sup>19</sup> .
1	0.3999	0.3993
2	0.3996	0.3990
3	0.4001	0.3999
4	0.4059	0.4053
5	0.4094	0.4088
6	0.4068	0.4062

Tenemos que el valor corregido de los mg pesados de vitamina “C” se calcula de la siguiente forma:

<sup>19</sup> Ver determinación en Anexo 5.

Debe basarse en el porcentaje de pureza que reporta nuestro certificado de calidad, para el caso en particular fue de 99.86% (Anexo 5). Los resultados se reportan en la tabla 12.

Si se comparan los datos prácticos con los reales (tabla 4), tomando en cuenta la cantidad real de vitamina C pesada, y debidamente corregida con su factor de pureza; se observa una mínima desviación de estos. Comprobando con esto que el método es efectivo en dicho análisis.

### 2.2.2. Cálculo de miligramos de vitamina “C”, estándar y jugo de naranja, por el método Yodométrico a microescala.

Para la determinación numérica de los resultados obtenidos a microescala se aplica la fórmula de la normalidad:

$$N = \frac{g \times H^+ \text{ C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 1000}{\text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{P.M. C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$$

Donde N se obtiene a partir de la Molaridad:

$$N = 2M$$

Debido a que en la reacción REDOX que se verifica entre el Tiosulfato de Sodio y la Vitamina “C” o Acido Ascórbico se intercambian 2 H<sup>+</sup>.

Por lo tanto:

$$N = 2 (3 \times 10^{-4})$$

$$N = 6 \times 10^{-4}$$



Luego, despejando de la ecuación g para obtener los gramos de ácido ascórbico tenemos que:

$$g = \frac{\text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{P.M. C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times N}{H^+ \text{ C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 1000}$$

Donde:

Vol Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = Volumen del titulante gastado en cada titulación

P.M. = Peso molecular de la sustancia analizada (176.13)

N = Normalidad de la solución titulante ( $6 \times 10^{-4}$ )

H<sup>+</sup> = Número de hidrógenos intercambiados en la reacción (2)

g = gramos de ácido ascórbico encontrados en la alícuota titulada.

Cabe mencionar que esta fórmula es adaptada al método debido a que la metodología de cálculos propuesta por el tratado de química a microescala consultado reflejaba una incongruencia a la hora de obtener los resultados finales: la relación entre titulante gastado y la cantidad de ácido ascórbico presente era inversamente proporcional, razón que no concuerda con los resultados reales.

Una vez encontrados los gramos presentes en la alícuota titulada (2 gotas ó 0.01190 ml), se procede mediante una regla de tres a obtener el contenido para 1 ml, y luego para la ración declarada en cada contenedor. (ver ejemplo de cálculos en anexo 4)

Los resultados se representan en la tabla 11, tabla 13 y tabla 14 del capítulo III.

2.2.3. Cálculo de miligramos de Vitamina “C” en jugo de naranja por el método de titulación 2,6-DCFIF

Fórmula general

$$\text{mg Vit "C"} = (X-B) * (F/E)*(V/Y)$$

Donde:

mg Vit C = miligramos de Vit C por mililitro

X= Volumen 2,6-DCPIP gastado.

B= Volumen consumido por el blanco.

F= mg Ac. Ascórbico / ml 2,6-DCPIP

E= mL ensayados

V= Volumen inicial (200 ml)

Y= Volumen de alicuota (16 ml)

Tabla 5. Resultados obtenidos mediante el análisis oficial con 2,6-DCFIF del jugo de naranja “TAMPICO” ®.

N° Tit.	X	B	F	E	V	Y	mg vit. C / ml	mg vit C/ 356 ml
1	<b>13.5</b>	0.2	0.136	100.0	200.0	16.0	0.2258	80.3732
2	<b>13.3</b>	0.2	0.136	100.0	200.0	16.0	0.2224	79.1646
3	<b>12.8</b>	0.2	0.136	100.0	200.0	16.0	0.2139	76.1431
							Total	235.6809
							Promedio	<b>78.5603</b>

#### 2.2.4. Cálculo de Incerteza:

El cálculo de las Incertezas en la medición de ambos métodos se hizo por medio de las fórmulas siguientes:

Incerteza absoluta

$$\Delta mg = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (1)$$

Donde:

$\Delta mg$  = Incerteza en la medida.

$X_1$  = mg/ml de Vitamina "C" encontrados por cada valoración.

$\bar{X}$  = Promedio de mg/ml de Vitamina "C" para "n" valoraciones.

n = Número de valoraciones realizadas por cada método.

Incerteza relativa:

$$\Delta mg = \Delta mg / \bar{mg} \quad (2)$$

Donde:

$\Delta mg$  = Incerteza Relativa.

$\Delta mg$  = Incerteza Absoluta.

$\bar{mg}$  = Promedio de miligramos de vitamina "C" encontrados.

2.2.4.1. Cálculo de la incerteza en la titulación de estándar de vitamina “C” por el método a microescala.

De la tabla 11, se obtiene el volumen gastado de titulante y se calculan los mg/ml de vitamina “C” presentes en el estándar o el jugo por cada titulación. Así se obtiene la siguiente tabla:

Tabla 6. Datos obtenidos de valoración estándar de vitamina “C” (1mg/ml) por el método a Microescala con solución de Tiosulfato  $3 \times 10^{-4} \text{M}$  (corregida)

Nº	mg/ml de Vitamina “C”
1	1.060
2	0.898
3	0.951
4	0.951
5	1.003
6	0.898

Introduciendo los datos en la fórmula (1) se obtiene el siguiente resultado:

$$\Delta \text{mg} = \pm 0.057 \text{ mg}$$

Calculando la Incerteza relativa de la fórmula (2)

Entonces para este caso, la incerteza relativa será:

$$\Delta \text{mg} = 0.059$$

2.2.4.2. Cálculo de la incerteza en la titulación de estándar de vitamina “C” por el método a Macroescala.

De la tabla 12, se obtiene la siguiente información:

Tabla 7. Valores obtenidos en mililitros de titulantes (yodo) en la valoración del estándar Acido Ascórbico de concentración conocida (400mg) mediante el método a Macroescala

Nº	mg de Vit. “C” presentes en 400 mg de muestra.
1	398.03
2	399.79
3	400.67
4	405.96
5	409.48
6	406.84

De fórmula (1) se calcula la incerteza:

$$\Delta mg = \pm 4.176 \text{ mg}$$

De fórmula (2) se calcula la incerteza relativa:

$$\Delta mg = 0.010$$

## 2.2.4.3. Cálculo de la incerteza en la medida en la valoración de jugo

TAMPICO por el método a microescala.

De la *tabla de resultados 14*, se obtuvieron los siguientes cálculos:

Tabla 8. Resultados del ensayo a microescala del jugo de naranja marca “TAMPICO”<sup>®</sup>.

Nº	mg de vitamina “C” en 8 onzas (356 ml)
1	92.4403
2	83.1963
3	73.9523

Entonces los resultados serian los siguientes:

De fórmula (1) se calcula la incerteza:

$$\Delta mg = \pm 7.548 \text{ mg}$$

De fórmula (2) se calcula la incerteza relativa:

$$\Delta mg = 0.091$$

2.2.4.4. Cálculo de la incerteza en la medida en la valoración de jugo TAMPICO por el método a macroescala 2,6- DCFIF.

De la tabla de resultados 5, se obtuvieron los siguientes cálculos:

Tabla 9. Resultados obtenidos mediante el análisis oficial con 2,6-DCFIF del jugo de naranja "TAMPICO" ®.

Nº	mg de vitamina "C" en 8 onzas (356 ml)
1	80.3732
2	79.1646
3	76.1431

Entonces los resultados serian los siguientes:

De fórmula (1) se calcula la incerteza:

$$\Delta mg = \pm 1.779 \text{ mg}$$

De fórmula (2) se calcula la incerteza relativa:

$$\Delta mg = 0.023$$

## 2.3. TRABAJO DE CAMPO

### 2.3.1. Análisis a Microescala

Para poder proceder a la comparación práctica de los métodos de análisis planteados anteriormente para la vitamina C, se llevó a cabo un número específico de ensayos utilizando cada uno de los métodos y verificando los resultados.

El ensayo a microescala constó de un método yodométrico de la vitamina C, siguiendo la marcha planteada en el “Journal of Chemical Education” en su artículo “The microscale laboratory”<sup>20</sup>, la cual es planteada específicamente para jugos de frutas entre ellos el de naranja (metodología 2.1.3.)

Para efectos de comparación de los métodos se utilizó una solución patrón de vitamina C pura de 1mg/mL para el de microescala y de 400 mg para macroescala.

Inicialmente se prepararon los reactivos a utilizar. Cuando se valoró la solución titulante para estandarizarla se encontró que la concentración práctica de ésta no coincidía con la teórica por lo que se repitió su preparación.

Los análisis se llevaron a cabo siguiendo al pie la marcha citada en el mismo artículo antes mencionado para vitamina C, sin embargo los primeros resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que se observaba una discrepancia de un dato a otro dentro del mismo análisis (tabla 10). Se hizo una retrospectiva de todos los pasos seguidos y se determinó que los factores ambientales dentro del laboratorio estaban interfiriendo con

---

<sup>20</sup> Kumar Vinay, Philip Courie, and Shari Haley; Northern Kentucky University Highland Heights, KY 41076.



dicho análisis. Se optó por idearse una forma de evitar la incidencia de la luz solar directa sobre la muestra analizada, y se repitió el análisis. En esta oportunidad, los resultados fueron mejorando pero aún no satisfactorios, encontrándose nuevamente que en esta oportunidad el fallo estaba en la concentración del titulante, corroborándose que la marcha proporcionada por el artículo no corresponde a la de la preparación de una solución de tiosulfato de sodio de la concentración requerida para el análisis por lo que fue necesaria efectuar la corrección de dicha marcha, así como también se determinó la necesidad de calibrar las jeringas utilizadas para el análisis dado que dependiendo del ángulo de goteo varía el volumen en mililitros gastado (anexo 3)

Una vez corregida la concentración del titulante y calibradas las jeringas, se verificó nuevamente el análisis obteniéndose los datos esperados (Tabla 11). Cabe mencionar que fue necesario realizar el análisis dentro de las instalaciones de un laboratorio particular para poder mantener algunos factores controlados como temperatura, luz y ventilación, a fin de favorecer el ensayo.

Ya comparados los métodos de análisis con la materia prima, se procedió a analizar muestras de jugo de naranja de una marca tomada como patrón, utilizando la marcha presentada en la metodología 2.1.3.

Nuevamente se obtuvieron datos no satisfactorios debido a que el jugo se mantenía fuera de refrigeración y la vitamina se degradaba rápidamente con la temperatura ambiente y el oxígeno atmosférico. Se tomó la decisión de mantener refrigerada la muestra durante el ensayo y solo tomar la porción necesaria para el análisis. Así, los resultados obtenidos fueron satisfactorios (tabla 13)

Posteriormente al verificar el comportamiento del método frente a la muestra patrón, se procedió a analizar 4 diferentes marcas de jugo de naranja (tabla 18), de las cuales una de ellas no era reportada como “enriquecida” con vitamina “C”. Esta marca de jugo de naranja no enriquecida contiene todos los componentes del resto de marcas exceptuando la vitamina “C”.

El resultado obtenido en dicho jugo, fue parecido a los resultados obtenidos en las diferentes marcas enriquecidas, razón por la cual se vio necesario realizar un ensayo con el método, utilizando como muestra un estándar de concentración conocida de ácido cítrico ya que es éste el acidificante reportado por el productor del jugo no enriquecido; y de esta manera se descartaría el hecho de cuantificar este ácido por medio del método yodométrico. Al efectuar este análisis se obtuvo un gasto de volumen idéntico al gastado con el jugo analizado; de este resultado se descartó que el método cuantificara ácido cítrico, pero de igual manera se determinó que en presencia de dicho ácido, el conjunto de reactivos empleados en la titulación dan como resultado la liberación de cierta cantidad de ion  $I^-$  pudiendo crear una interferencia a la hora del análisis.

En teoría, los resultados de la cuantificación que deben esperarse de un análisis de vitamina C (en jugo de naranja) se encuentran en un rango de 157–193 mg por porción (8 onz.) debido a que esta vitamina es fácilmente oxidada por factores como el oxígeno atmosférico, la temperatura, la luz entre otros; razón por la cual el valor esperado de dicha titulación es más alto que la ración diaria recomendada (RDA) ya que debe garantizarse que al momento de su ingesta, el jugo contenga por lo menos los 60 mg de ácido ascórbico necesarios, previendo su degradación durante el almacenaje, transporte y comercialización.

### 2.3.2. Análisis a Macroescala.

En los análisis a macroescala se efectuaron 6 análisis para la solución estándar, siguiendo la marcha de la USP XX sin que se reportará alguna interferencia o limitante en el transcurso de las mismas. Los datos obtenidos se reportan en la tabla 12.

Se trató de filtrar la muestra para decolorarla, además de realizar una dilución del jugo a la décima parte de su concentración para utilizar una alícuota menor de la teóricamente requerida; pero se encuentra el inconveniente de que al mantener el jugo mucho tiempo fuera del refrigerador y frente a la luz para darle tratamiento, la vitamina se oxida rápidamente y los resultados no varían mucho ya que igualmente se dificulta su titulación. Por lo tanto no fue posible verificar la titulación Yodimétrica del ácido ascórbico en jugo de naranja por medio del método a macroescala.

### 2.3.3. Comparación del análisis en jugos siguiendo el análisis oficial, 2,6-dicloroindofenol; propuesto por “official methods of análisis (AOAC)”.

Al no ser posible la evaluación del método yodométrico propuesto en este trabajo de graduación debido a la dificultad de cuantificar ácido ascórbico en jugo de naranja mediante el método yodimétrico según la USP XX, se decidió evaluar la exactitud del primero, por medio de su comparación con el método oficial para jugos de frutas, utilizando el reactivo 2,6-Dicloroindofenol ( ó 2,6-DCFIF).

La evaluación con éste método oficial consistió en analizar una materia prima estandarizada de vitamina C, y luego la cuantificación de la misma contenida en una

muestra de jugo de naranja de consumo popular, previamente analizada mediante el método yodométrico, y luego se verificaría la similitud de ambos resultados (tabla 16).

**CAPITULO III**  
**RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE**  
**RESULTADOS**

### 3.0. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1. Análisis de ácido ascórbico en materia prima

A continuación se presentan las tablas 10 y 11 con los diferentes resultados previos al cálculo del contenido de vitamina C, obtenidos de las titulaciones del Acido Ascórbico en materia prima y jugo de naranja. Los ensayos mostrados en la tabla 10 se descartaron por no presentar datos confiables debido a la variabilidad de resultados. Esto representa un error muy grande en las valoraciones a microescala, donde las concentraciones de reactivos que se usan son de 0.01 M y un diferencial de volumen de esa magnitud es crítico. La calibración de las jeringas (ver anexo 3), es de gran importancia para la obtención de mediciones más precisas. Este procedimiento da por resultado un cambio notable en el valor de cada medición; los datos mostrados en la tabla 11 demuestran una menor diferencia entre los valores medidos.

Tabla 10. Valoración de solución estándar de Vitamina “C” 1.0 mg/ml con el método a Microescala.

Valoración N°	Volumen consumido*
1	0.52 ml
2	0.25 ml
3	No hubo cambio
4	0.65 ml
5	0.08 ml
6	0.22 ml

Lectura tomada directamente de la jeringa

Con estos resultados se determina la necesidad de calibrar el equipo previo a su uso. La calibración de las jeringas se cuantificará con el número de gotas gastadas y se hará la correspondiente conversión de éstas a mililitros.

Hay que tomar en cuenta que, la densidad del agua a una determinada temperatura es una de las herramientas más útiles en este proceso de calibración (Anexo 6) ya que los cambios de temperatura afectan el volumen y por lo tanto, en este caso, la medición de las soluciones.

Tabla 11. Datos obtenidos de valoración estándar de vitamina “C” (1mg/mL)\* por el método a Microescala con solución de Tiosulfato de Sodio  $3 \times 10^{-4}$  M (corregido)

Valoración N°	Gotas gastadas	Volumen consumido**	mg/ml de Vitamina “C”
1	40	0.2339 ml	1.060
2	34	0.1988 ml	0.898
3	36	0.2105 ml	0.951
4	38	0.2105 ml	0.951
5	36	0.2222 ml	1.003
6	34	0.1988 ml	0.898

\* Valores en ml. Utilizando jeringa calibrada ( 1gota Vit. C =  $5.9512 \times 10^{-3}$  ml.)

\*\* Valores en ml. Utilizando jeringa calibrada ( 1gota  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  =  $5.8620 \times 10^{-3}$  ml.)

Tomando en cuenta que los cálculos se trabajan utilizando los valores reales corregidos para todas las mediciones, incluyendo la pureza del estándar, observamos una cercanía muy real y precisa de los datos obtenidos prácticamente y de los datos esperados en teoría, dándonos estos resultados una confiabilidad del método y su funcionalidad en el análisis.

Tabla 12. Datos obtenidos en mg de la valoración del estándar de Acido Ascórbico de concentración conocida (400mg) mediante el método a Macroescala

mg de vitamina "C" pesados en cada determinación	Volumen de yodo 0.1 N gastado (ml)	mg de vitamina C presentes en muestra determinados prácticamente
399.30	45.2	398.03
399.00	45.4	399.79
399.90	45.5	400.67
405.30	46.1	405.96
408.80	46.5	409.48
406.20	46.2	406.84

Así, si se comparan los datos prácticos con los reales, tomando en cuenta la cantidad real de vitamina C pesada, y debidamente corregida con su factor de pureza; se observa una mínima desviación de estos. Comprobando con esto que el método es efectivo en dicho análisis. No obstante al tratar de analizar las muestras de jugo de naranja con éste método se encontró la limitante mayor: la coloración de la muestra interfiere considerablemente con la detección del punto final de la titulación, siendo imposible su cuantificación.

### 3.2. Análisis de Vitamina C en jugos de naranja.

Tabla 13. Datos obtenidos en la valoración a Microescala de la muestra de jugo patrón Sunny Delight tomada como referencia

Valoración N°	Gotas Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Volumen Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> *	Tiempo (seg.)	mg de Vitamina "C" aportado por ración (240 mL)
1	11	0.065 ml	32	62.27
2	13	0.077 ml	30	82.06
3	10	0.060 ml	29	63.94
4	13	0.077 ml	99	82.06
5	15	0.089 ml	33	94.84
6	13	0.077 ml	29	82.06

\*Valores en ml. Utilizando jeringa calibrada ( 1 gota =  $5.9512 \times 10^{-3}$  ml.)



Tabla 14. Resultados del ensayo a Microescala del jugo de naranja TAMPICO®.

N° Tit.	Gotas Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	g Vit "C"/0.0119mL	mg Vit "C"/ mL	g Vit "C"/356 mL	mg Vit "C"/356 mL
1	10	<b>0.0585</b>	3.0900E-06	0.2597	9.2440E-02	92.4403
2	9	<b>0.0526</b>	2.7810E-06	0.2337	8.3196E-02	83.1963
3	8	<b>0.0468</b>	2.4720E-06	0.2077	7.3952E-02	73.9523
Total				0.7011		249.5889
Promedio				<b>0.2337</b>		<b>83.1963</b>

Analizando los resultados reportados en las tablas 13 y 14, se puede concluir que según lo declarado, por el productor en la etiqueta, ésta cumple con la aportación de RDA mínima por porción. Así mismo se demuestra que el método de análisis a microescala es efectivo para determinar esta cantidad de vitamina C aportada con la ventaja de utilizar sólo dos gotas de jugo como muestra. Con estos resultados se comprueba la mayor ventaja del método yodométrico a microescala con el yodimétrico tradicional, pues aún y con la muestra coloreada se pueden obtener datos certeros, sin interferencia y sin tratamiento previo de la muestra, a diferencia del método a macroescala el cual debido a la interferencia del color y pese a una filtración previa de la muestra para reducir la intensidad del mismo fue imposible verificar dicha cuantificación.

Tabla 15. Resultados obtenidos del análisis oficial con 2,6-Dicloroindofenol

Muestra analizada	mL gastados de 2,6-DCFIF	mg o ml utilizados de muestra para la titulación	miligramos encontrados/ración
Solución estándar de Vitamina C 1mg / mL	18.0	2 ml.	- *
	17.8	2 ml.	-
	17.8	2 ml.	-
Jugo de naranja TAMPICO	13.5	16 ml	80.37
	13.3	16 ml	79.16
	13.0	16 ml	77.35

\* El valor gastado con el estándar se utiliza para encontrar el factor F del reactivo 2,6-DCFIF.

Los datos obtenidos en la tabla 15, son el producto del análisis oficial establecido por la AOAC, teniendo en cuenta que tuvo que ser realizado con reactivo recientemente preparado. Es de hacer notar que la relación de los datos de los análisis sucesivos son similares y la muestra presenta un comportamiento similar en ambos métodos, es decir que la concentración encontrada de vitamina C se ve disminuida a medida pasa el tiempo de apertura del frasco, debido a los efectos degradativos del ambiente sobre aquella. De este resultado se determina la necesidad de mantener la muestra en refrigeración durante el análisis y de estar tomando únicamente la alícuota necesaria.

Tabla 16. Comparación en los resultados obtenidos para el análisis del jugo de naranja marca “TAMPICO”<sup>®</sup>, utilizando los métodos 2,6-DCFIF a macroescala y yodométrico a microescala.

No. de muestra	Macroescala	Microescala
	mg encontrados / porción	mg encontrados / porción
1	80.3732	92.4403
2	79.1646	83.1963
3	76.1431	73.9523
Promedio	<b>78.5603</b>	<b>83.1963</b>

1 porción = 356 mL.

La diferencia obtenida entre ambos métodos es de 4.636 mg / porción, dato que si bien es cierto resulta elevado puede deberse no solo a la discrepancia de los métodos sino también a errores de paralaje, efectos de degradación sobre la muestra analizada a macroescala ya que permanece expuesta al ambiente por más tiempo durante el análisis. Así mismo reafirmamos que el comportamiento de la muestra es igual en ambos métodos debido a la degradación de la vitamina C. No obstante, es de notar que el valor real encontrado se encuentra más cercano al rotulado el obtenido en el análisis a microescala.

Tabla 17. Resultados obtenidos en la determinación de la incerteza en la medida para los métodos de análisis utilizados (Yodometrico a Microescala, Yodimetrico a Macroescala y valoración a Macroescala con el reactivo 2,6-DCFIF)

<b>Método</b>	<b>Valoración</b>	<b>Incerteza Absoluta (<math>\pm \Delta</math> mg)</b>	<b>Incerteza Relativa (<math>\Delta</math> mg)</b>
Microescala	St. Vit. C (1mg/ml)	$\pm 0.057$	0.059
	Jugo TAMPICO <sup>®</sup>	$\pm 7.548$	0.091
Macroescala (2,6-DCIF)	St. Vit. C (400 mg)	$\pm 4.176$	0.010
	Jugo TAMPICO <sup>®</sup>	$\pm 1.779$	0.023

Para poder analizar de una manera más justa se tomó la decisión de comparar los resultados en términos de Incerteza relativa; ya que esta permite evaluar la calidad de la medición realizada. La relación de la incerteza relativa con respecto a la medición es directamente proporcional, ósea que, mientras más pequeño sea el valor de la incerteza relativa mejor será la medición.

Para el caso de la tabla 17, se puede observar que el método que posee mejor calidad de medición es el yodométrico a macroescala (titulación con yodo) ya que tiene una incerteza de 0.010 mg por cada miligramo encontrado; seguido por el método oficial con una incerteza de 0.023 mg por cada miligramo encontrado. Sin menospreciar los datos resultantes de las titulaciones a microescala, se puede presumir que los valores son aceptables aunque no los requeridos para aseverar que el método es mejor que los ya oficiales. A nuestro criterio, las pruebas a microescala son una buena opción para fines didácticos o de prácticas de laboratorio ya que como se observa sus datos de respuesta andan entre el rango de RDA recomendado. Para fines de análisis de laboratorio de control de calidad se deberá trabajar más en la estandarización del método. En general se debe aclarar que, para determinar con certeza qué método da las mejores mediciones habrá que equipararlos; es decir se tendrá que validar tanto el método a microescala como los instrumentos y equipo a utilizar en el análisis para

determinar los parámetros de linealidad, repetitividad, exactitud y precisión que estos ensayos poseen y corregirlos a través de calibración de equipo de medición y de titulación a utilizar.

Existen muchos factores que pudieron intervenir en el análisis a microescala, estos se enumeran en las observaciones para que sean tomados en cuenta por el analista.

### **Resultados obtenidos de los análisis yodométricas a microescala de diversas marcas de jugo.**

Tabla 18. Resumen de los resultados de las titulaciones a microescala de 4 marcas de jugos de naranja reportados como enriquecidos con vitamina C, jugo no enriquecido y estándar de vitamina “C”.

<b>Muestra</b>	<b>Valor promedio de gotas de titulante gastado</b>	<b>Volumen de Tiosulfato gastado (mL)</b>	<b>miligramos de vitamina “C” encontrados</b>	<b>miligramos de vitamina “C” por ración</b>	<b>% de vit. “C” declarados en la etiqueta según RDA</b>
Estándar de vitamina C	36.33	0.21250	0.9436 mg/ml	--	--
Sunny Delight	12.5	0.07400	0.3245 mg/ml	77.87 mg/240 ml	100 %
Jugwai <sup>21</sup>	8.30	0.04853	0.2155 mg/ml	--	--
Naranjito	14.00	0.08187	0.3635 mg/ml	87.24 mg /240 ml	69 %
Foremost	15.67	0.09164	0.4069 mg/ml	97.66 mg/240 ml	100%
Tampico	11.33	0.06626	0.2337 mg/ml	83.20 mg/356 ml	100%

<sup>21</sup> Jugo no reportado como enriquecido con vitamina “C”.

### 3.3.Comparación de los métodos estudiados.

MICROESCALA	MACROESCALA
Economiza reactivos y materiales	Mayor gasto de reactivos por lo que se requiere de mayor inversión.
Reduce el tiempo invertido	Se invierte mayor tiempo por análisis
Menor producción de desechos	Menor facilidad para desechar las muestras analizadas, requiriendo en algunos casos la neutralización de la misma
No se necesita un gran espacio de trabajo	Se necesita mayor espacio de trabajo
Menor riesgo de accidentes	Mayor probabilidad de sufrir accidentes de trabajo por manejarse volúmenes grandes y reactivos más concentrados.
Menos intoxicación por exposición a reactivos dañinos.	El analista se arriesga más a una intoxicación por exposición.
Bajo índice de contaminación ambiental	Produce mayor índice de contaminación ambiental
Puede utilizarse material improvisado debidamente calibrado para su práctica.	El material a utilizar debe ser específico para el tipo de análisis que se realizará, no pudiendo improvisar.
Acertación en los datos	Son métodos ya conocidos y estandarizados, que proporcionan datos confiables.
No se presenta interferencia con muestras coloreadas	Se presenta una mayor incidencia de interferencia para muestras coloreadas.
La cantidad de muestra a utilizar es pequeña, pudiendo aumentar el número de análisis a practicar.	Requiere de mayor cantidad de muestra
No requiere de tratamiento previo de las muestras.	Generalmente se necesita invertir en un tratamiento a la muestra previo al análisis.
Más amplia variedad de aplicación de experimentos ya que pueden utilizarse reactivos más costosos.	En el área didáctica, requiere de mayor inversión en materiales y cristalería para suplir las necesidades estudiantiles.
El analista tiende a concentrarse más y a afinar su desarrollo analítico.	Comparativamente, requiere menor destreza por parte del analista.
Requiere de mayor destreza para la manipulación de volúmenes pequeños para no sobrepasarse en las mediciones	Fácil manejo de reactivos y materiales. Mejor medición en los reactivos y cantidades, menos riesgo de sobrepasarse en dichas mediciones.

MICROESCALA	MACROESCALA
Se necesita en ocasiones mantener algunas condiciones especiales para evitar interferencias ambientales grandes, como en el caso de reacciones REDOX.	En el caso específico de las reacciones REDOX, permiten más tiempo para realizar el análisis pues la cantidad del analito es tal que no se oxida rápidamente
Los reactivos deben prepararse adecuadamente puesto que un grano o cristal de reactivo más o menos hace variar grandemente la concentración imposibilitando de determinación.	La concentración de los reactivos puede no ser exacta, sin que esto altere grandemente los resultados siempre y cuando se obtenga su factor de corrección respectivo.
Muchas de las marchas analíticas a microescala no son oficiales	Utilizada oficialmente
Se necesita que el analista este muy atento para determinar el punto final de la reacción	En muestras claras, mayor facilidad para detectar el viraje de color.
Dificultad para aplicar técnicas como destilación fraccionada, destilación al vacío y extracción con embudos de separación.	No existe limitante alguna para la aplicación de técnicas a macroescala
El requerimiento de reactivos mucho más puros y de una escrupulosa limpieza del material y la limitación de no poder sellar con grasa puntas esmeriladas.	Es importante cumplir con la concentración requerida de la solución titulante no tanto como con su pureza pues en la mayoría de los casos es calidad analítica.
La muestra se ve muy influenciada por las condiciones ambientales del lugar de trabajo.	No hay mucha interferencia con los factores ambientales

## **IV. OBSERVACIONES**

Con referencia al método a Microescala se observa:

1. El rango en el que se utilizan las soluciones titulantes oscila entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$  M.
2. La muestra es de obtención aleatoria, y se tendrá que mantener en condiciones adecuadas. El punto final puede visualizarse perfectamente independientemente del color de la muestra.
3. Tanto el estándar como la solución indicadora se utilizaron de preparación reciente.
4. Debe de estandarizarse la cantidad de solución indicadora a usarse.
5. La preparación y los análisis se verificaron en un menor tiempo y los resultados se obtuvieron más rápido.
6. En microescala se puede utilizar material debidamente calibrado como goteros, jeringas, entre otros.
7. Tanto la temperatura ambiental como la luz solar son dos factores determinantes para la obtención de datos confiables; proteger las muestras debidamente para su análisis.
8. Deberá tomarse en cuenta que los jugos que declaren en su contenido ácido cítrico como acidificante deberán ser titulados con especial cuidado y de manera más rápida para evitar la interferencia del mismo en la titulación.
9. Es necesario aclarar que este método de análisis al igual que en macroescala no es ESPECIFICO para la determinación de la vitamina C en jugo natural.



De las prácticas verificadas a macroescala se observó:

1. El color de la muestra causa interferencia en la detección del punto final en yodimetría.
2. Se titula fácilmente la solución estándar.
3. Debe cumplirse con las buenas prácticas de laboratorio.
4. Se requiere una preparación de la muestra previa al análisis.
5. Los reactivos deben ser de preparación reciente.
6. En el método del 2,6-DCFIF no es necesaria la utilización de agua libre de  $\text{CO}_2$ .

## **V. CONCLUSIONES.**

1. El CO<sub>2</sub> dentro del análisis a microescala es un agente oxidante potente debido a que la cantidad de ácido ascórbico es muy pequeña en los análisis.
2. El tiempo y condiciones de almacenamiento de las muestras en estanterías pueden ocasionar degradación a la vitamina “C” si no son las adecuadas
3. La cuantificación de vitamina “C” en jugos de naranja puede ser realizada mediante el método a microescala YODOMETRICO obteniéndose resultados satisfactorios y similares al método oficial.
4. Se concluye que las marcas de jugo analizadas, reportadas como enriquecidas con vitamina “C” sí aportan al consumidor la cantidad mínima recomendada por las entidades de salud.
5. En las titulaciones yodimétricas a macroescala no se aprecia bien la llegada del punto final, por el color del agente titulante, en la yodometría a microescala si se logra visualizar, pues la intensidad en el color de la muestra no es un factor determinante para la detección del punto final.
6. Los resultados que se obtienen en las titulaciones a macroescala y microescala son muy parecidos con la diferencia que a macroescala se requiere de un tratamiento previo de la muestra para eliminar interferencias., mayor cantidad de reactivos, controlar el pH de la muestra.
7. Los reactivos que se utilizan para el método a macroescala son más corrosivos y tóxicos.
8. Las cantidades de vitamina “C” encontradas en los jugos ensayados están arriba de la RDA en cada porción tomada.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Cabe recordar que para oficializar un método éste debe ser validado y probado más veces frente a otras muestras, para obtener datos fiables.
2. Se recomienda trabajar con agua libre de CO<sub>2</sub>.
3. La muestra y los reactivos deben ser conservados en un lugar fresco y con iluminación adecuada antes y durante el ensayo. La muestra de preferencia debe estar refrigerada y ser obtenida minutos antes del análisis.
4. Para valorar con tiosulfato de sodio es necesario utilizar material de vidrio y protegerlo de la luz.
5. Es necesario llevar a cabo un blanco junto a la titulación de la muestra.
6. Deberá analizarse previamente la formulación declarada en la muestra para determinar si alguno de los componentes incluidos puede ser cuantificado con el mismo método y evitar las interferencias, como es el caso de la glucosa.
7. Se recomienda verificar si los valores obtenidos en las titulaciones realizadas a microescala, son o no producto de la adición por la cuantificación de más de un componente de la formulación del jugo que también sea agente oxidante para el yodo, como por ejemplo en el caso de la glucosa, un edulcorante utilizado en muchas formulaciones de jugos y que a su vez se sabe que a nivel de macroescala se utiliza la titulación yodométrica para cuantificarla. Como se repite, no se conoce mucho sobre el comportamiento de las soluciones a concentraciones pequeñas (menores de 0.01 M) ni de su forma de reaccionar frente a otros agentes externos. Lo interesante de todo esto es que mucha de la bibliografía utilizada en las universidades de los Estado Unidos de Norteamérica al referirse a la cuantificación a microescala de vitamina “C” en jugos de naranja menciona las titulaciones yodométricas y yodimétricas como

una marcha a seguir para dicho fin. Es necesario por consiguiente estudiar más a fondo todos los factores que pueden de una manera u otra dar una pauta para la utilización de este método de titulación en jugos de naranja.

8. Es de mucha importancia saber reconocer las ventajas y desventajas que cada uno de los métodos de análisis ofrecen tanto a la educación como a la industria en general. Basándose en el diagnóstico preciso de los resultados obtenidos después de un estudio de impacto ambiental y de toxicidad de los reactivos implicados en cada uno de los análisis sería justo implementar o conjugar técnicas que permitan reconocer en sus procesos la filosofía de la química verde y más en esencia el nuevo concepto de RESPONSABILIDAD INTEGRAL, el cual involucra el trabajo en equipo de una industria con su alrededor socio ambiental.

## BIBLIOGRAFIA

1. BAIR, D.C., “EXPERIMENTACIÓN, Una introducción a la teoría de mediciones y al diseño de experimentos”, Prentice – Hall Hispanoamericana, S.A. Traducción al español de la segunda edición, México 1991.
2. CÁCERES CHIQUILLOS, M.E. – LÓPEZ TORRES A.B. “Índice referencial de parámetros físicos químicos y microbiológicos, necesarios para el registro de alimentos y bebidas, en el departamento de control de alimentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social”, Tesis para optar al grado de Licenciada en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Septiembre, 2000.
3. CLARKE, EGC; “Aislamiento e Identificación de medicamentos”, 1ª edición, Todd, R.G. editor general, 1974.
4. CODEX ALIMENTARIUS , “Normas del Códex para jugos de fruta, Jugos concentrados de fruta, néctares de fruta”, Vol. X, primera edición, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación - OMS, Roma.1982.
5. HAQUE HASHMI, Manzur, “Análisis de Vitaminas en formas farmacéuticas”, 1ª edición, Publicaciones Wiley- Interscience, 1973.
6. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, Edited by Sidney Williams, 14<sup>th</sup> edition, 1984.
7. VILLE, C.; “Biología”, séptima edición, editorial McGraw-hill Interamericana, México 1994, págs. 5, 381.

8. GOODMAN & GILMAN; “Las bases farmacológicas de la terapéutica”, novena edición, vol. II; editorial McGraw-Hill Interamericana, México, 1996.
9. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION Inc., “The United States Pharmacopeia”, 22th. edition, oficial desde Enero 1989.
10. DANIEL C. HARRIS; Quantitative Chemical Analysis., Cuarta Edición. Michelson Laboratory China Lake, California W.H. Freeman and Company, New York 1995.
11. VINAY KUMAR, “Quantitative Microscale Determination of Vitamin C”, Journal of Chemical Education, volume 69, Number 8, Agosto 1992.
12. SINGH, MONO M.; Szafran, Zvi; Pike, Ronald M. Microscale Chemistry and Green Chemistry: Complementary Pedagogies. Journal of Chemical Education 1999 vol 76 N° 12 1684.
13. Dr. Mono M. Singh director ejecutivo NMC2 (siglas en Inglés National Microscale Center 2), Merrimack College, <http://www.msingh@merrimack.edu>.
14. Microscale Chemistry in undergraduate teaching laboratories. [http://www.p2000.umich.edu/chemical\\_waste/cw7.htm](http://www.p2000.umich.edu/chemical_waste/cw7.htm)
15. National Microscale Chemistry Center, “What is Microscale?, How is Microscale Practiced? <http://www.silvertech.com/microscale/>
16. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COMAHUC. Facultad de Ingeniería. Argentina. Notas de Laboratorio: Cómo elaborar un informe de laboratorio. Errores. <http://fain.uncoma.edu.ar/fisica/NL.htm>



## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

### Preparación de Reactivos

- a) Preparación de Reactivos para el método Yodimétrico a Macroescala.

**Solución de Yodo 0.1 N.- P.M. = 126.90 (12.96 en 100 ml).** Disolver aproximadamente 14 g de yodo en una solución de 36 g de Yoduro de potasio en 100 ml de agua, adicionar 3 gotas de ácido clorhídrico, diluir con agua hasta 1000 ml, y estandarizar con la solución de tiosulfato de sodio 0.1N.

Transferir 25 ml de solución de yodo a un erlenmeyer de 250 ml, diluir con agua a 100 ml y titular con tiosulfato de sodio 0.1 N VS hasta que la solución tenga un color amarillo pálido; adicionar 2 ml de almidón TS y continuar titulado hasta que la solución sea incolora. Calcular la normalidad. Preservar en contenedores color ámbar con tapón de vidrio.

**Solución de Tiosulfato de Sodio 0.1 N.-** Disolver aproximadamente 26 g de tiosulfato de sodio y 200 mg de Carbonato de sodio en 1000 ml de agua libre de dióxido de carbono. Estandarizar la solución como sigue.

Pesar exactamente de 210 mg de estándar primario de dicromato de potasio previamente pulverizado y secado a 120°C por 4 horas, disolver en 100 ml de agua en un erlenmeyer de 500 ml con tapón esmerilado. Agitar para disolver el sólido, retirar el tapón y agregar rápidamente 3 g de yoduro de potasio, 2 g de bicarbonato de sodio y 5 ml de ácido clorhídrico. Tapar el erlenmeyer nuevamente, agitar para homogenizar y dejar reposando en la oscuridad por 10 minutos. Enjuagar el tapón y las paredes internas del erlenmeyer con agua destilada y titular el yodo liberado con la solución de

tiosulfato de sodio hasta que la solución se torne amarillo verdosa. Adicionar 3 ml de solución de almidón TS y continuar la titulación hasta la desaparición de color azul de la solución. Calcular la normalidad. Reestandarizar la solución frecuentemente.

b) Preparación de reactivos para el Método Yodométrico a Microescala.

**Solución indicadora de almidón al 1%:** Adicionar aproximadamente 0.5g de almidón soluble a 5 mililitros de agua. Adicionar traza de  $\text{HgI}_2$  como preservativo. Mezclar los ingredientes hasta formar una pasta. Colocar la pasta en 45 mililitros de agua hirviendo y agitar continuamente. Continuar la ebullición hasta que la solución aclare.

**Tiosulfato de sodio  $3 \times 10^{-4}$  molar:** la concentración de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  es un factor importante en la determinación de ácido ascórbico, una concentración menor de 0.0002 M produce un punto final tardío y una concentración de 0.0004 M a mayor resulta en una más baja precisión. Para prevenir una desproporción de ion tiosulfato por disolución de  $\text{CO}_2$ . Este último se remueve por ebullición de 300 mililitros de agua destilada y enfriamiento posterior a temperatura ambiente. Pesar aproximadamente 19 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , colocarlo en un balón volumétrico de 250 mililitros, adicionar una traza de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a la solución como preservativo y diluir hasta la marca con agua destilada. Guardar la solución de Tiosulfato de sodio en un frasco ámbar.

**Estandarización del Tiosulfato de sodio:** transferir 2 gotas de la solución estándar de yodato de potasio en un “well plate de 24” . Adicionar aproximadamente 3 cristales de

KI y 5 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M sobre el mismo plato. Titular adicionando la solución de Tiosulfato manteniendo la placa de reacción de vidrio en el agitador eléctrico y agitar con movimientos circulares. Seguir adicionando solución de tiosulfato hasta que la solución se torne amarillo pálido. Adicionar una gota de solución indicadora de almidón. La solución a este punto podría ser violeta o azul oscuro. Continuar titulado hasta que la solución sea incolora. Repetir la titulación al menos tres veces.

***Estándar de yodato de potasio,  $1.00 \times 10^{-3}$  M:*** pesar exactamente 65.0 mg de yodato de potasio sólido y disolver en 250 mililitros de agua destilada en un balón volumétrico.

## ANEXO 2.

### Costos en la implementación de un laboratorio a microescala

Conversion to a microscale chemistry laboratory program in organic and/or inorganic and general chemistry requires an initial outlay of funds. An important factor in funding the conversion of chemistry programs to the microscale level is the large savings in operational expenses for laboratories due to decreased chemical, glassware, insurance, storage, energy and waste disposal costs. The expense for equipping one laboratory which is used for several sections is shown below. It is assumed that the laboratory is already fitted with regular laboratory items such as iron mongary and modern instruments such as GC, IR, NMR etc.

#### Organic/Inorganic Laboratory with 20 students per section

Glassware (1 kit/student) @ \$150.00/kit - \$3,000.00  
 Micro Balances (4) - \$4,000.00  
 Auto. Delivery Pipets (4) - \$800.00  
 Melting Point Appar. (2) - \$4,000.00  
 Mag. Stir. Hot Plates (20) - \$6,000.00  
 Other Glassware\* - \$1,000.00  
**TOTAL - \$18,800.00**

#### General Chemistry Laboratory with 20 students per section

Glassware (1 kit/2 student) @ \$100.00/kit - \$1,000.00  
 Micro Balances (4) - \$4,000.00  
 Auto. Delivery Pipets (4) - \$800.00  
 Melting Point Appar. (2) - \$4,000.00  
 Mag Stir Hot Plates (10) - \$3,000.00  
 Other Glass-ware\* - \$1,000.00  
**TOTAL - \$14,600**

The table below presents a per student comparison of traditional vs. micro chemical purchasing costs for the Chemistry 216 course at the U-M. The experiments were performed during the 1996 spring semester. All costs were taken from the 1994/95 Aldrich catalogue.

Experiment	Traditional Cost	Micro Cost
Acetanilide	0.46	\$0.05
Adol Condensation	\$5.20	\$0.23
Sodium Borohydride Reduction	\$0.16	\$0.02
Electrophilic Aromatic Substitution	\$1.01	\$0.02
Diphenylacetylene	\$0.99	\$0.10
Tetraphenylcyclopentadienone	\$2.11	\$0.08
Total	\$9.93	\$0.50

Merrimack College  
 315 Turnpike St.  
 N. Andover, MA 01845  
 Voice: 978.837.5137  
 Fax: 978.837.5017

### ANEXO 3.

#### Calibración de las micro buretas (jeringas).

Las micro buretas se calibran determinando cuanto pesan 30 gotas de agua destilada a temperatura ambiente. Luego por medio del uso de la densidad corregida del agua a la temperatura de trabajo<sup>22</sup> (Anexo 6) se convierten los gramos en mililitros y se saca un factor de equivalencia de gotas a mililitros. El procedimiento se realiza tres veces y se determina el valor promedio.

##### a) Calibración de las jeringas para el Tiosulfato de Sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

Nº	Peso de 30 gotas de agua (gramos)	Peso de 1 gota de agua (gramos)	Volumen de 1 gota de agua (ml)	Nº gotas para 1 ml
1	0.1805	6.0166E-03	6.0393E-03	165.58
2	0.1801	6.0033E-03	6.0260E-03	165.95
3	0.1650	5.5000E-03	5.5208E-03	181.13
Total	0.5256	1.7520E-02	1.7586E-02	512.66
Promedio	<b>0.1752</b>	<b>5.8400E-03</b>	<b>5.8620E-03</b>	<b>170.89</b>

Para el calculo del factor de conversión de gotas a mililitros se realizó el procedimiento de calibración sugerido por el journal de educación química (Journal of Chemical Education) volumen 69, número 8 “Quantitative Microscale Determination of Vitamin C”.

A continuación se detalla un ejemplo de los cálculos a seguir para la determinación de dicho factor:

Para el dato N° 1 de la tabla de arriba se tiene que 30 gotas de agua pesan 0.1805 gramos. Entonces, los gramos para una gota de agua equivalen a  $6.0166 \times 10^{-3} \text{ g}$ .

<sup>22</sup> Daniel C. Harris; Quantitative Chemical Analysis., pag 36. Cuarta Edición.

De la tabla de densidades del agua se toma el valor correspondiente a la densidad de esta a 28°C ( $\delta_{\text{H}_2\text{O}}_{28^\circ\text{C}}=0.9962365 \text{ g/ml}$ ) y haciendo uso de la formula de densidad ( $\delta=m/v$ ) se calcula el volumen en mililitros para una gota de agua ( $6.0393 \times 10^{-3} \text{ ml}$ ). Posteriormente, se calculan el número de gotas necesarias para 1 ml de agua (165.58 gotas).

Esto se realiza con el fin de comprobar la veracidad del calculo anterior o también para obtener un factor directo de conversión, que convierta el número de gotas utilizadas en la titulación a mililitros, que resulta de dividir  $1 \text{ ml} / 165.58 \text{ gotas} = 6.0393 \times 10^{-3} \text{ ml/gotas}$ .

Este mismo procedimiento se sigue para la calibración de las jeringas para Yoduro de Potasio y Acido Ascórbico.

b) Calibración de las jeringas para el Yoduro de Potasio ( $\text{KIO}_3$ )

Nº	Peso de 30 gotas de agua (gramos)	Peso de 1 gota de agua (gramos)	Volumen de 1 gota de agua (ml)	Nº gotas para 1 ml
1	0.1755	5.8500E-03	5.8721E-03	170.30
2	0.1832	6.1060E-03	6.1291E-03	163.16
3	0.1801	6.0030E-03	6.0257E-03	165.96
Total	0.5388	1.7959E-02	1.8027E-02	499.42
Promedio	<b>0.1796</b>	<b>5.9863E-03</b>	<b>6.0090E-03</b>	<b>166.47</b>

c) Calibración de las jeringas para el Acido Ascórbico (Vitamina C)

Nº	Peso de 30 gotas de agua (gramos)	Peso de 1 gota de agua (gramos)	Volumen de 1 gota de agua (ml)	Nº gotas para 1 ml
1	0.1824	6.0800E-03	6.1029E-03	163.86
2	0.1819	6.0633E-03	6.0862E-03	164.31
3	0.1693	5.6433E-03	5.6646E-03	176.53
Total	0.5336	1.7787E-02	1.7854E-02	504.70
Promedio	<b>0.1779</b>	<b>5.9289E-03</b>	<b>5.9512E-03</b>	<b>168.23</b>

## ANEXO 4.

### Ejemplo de metodología de cálculos.

- **Cálculo de miligramos de vitamina “C” materia prima por el método Yodimétrico a Macroescala.**

Tenemos :

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mL} & \text{—————} & 8.806 \text{ mg} \\ X \text{ mL} & \text{—————} & Y \end{array}$$

Ver valor de “X” en tabla 12.

- **Cálculo de miligramos de vitamina “C”, en estándar y jugo de naranja, por el método Yodométrico a microescala.**

Así:

$$\begin{array}{rcl} g & \text{—————} & 0.01190 \text{ ml} \\ x & \text{—————} & 1 \text{ ml} \end{array}$$

Donde:

g: Gramos de vitamina “C” presentes en la alícuota tomada.

x: Gramos de vitamina “C” presentes por 1 mililitro de jugo.

Luego:

$$\begin{array}{rcl} x & \text{—————} & 1 \text{ ml} \\ y & \text{—————} & \text{Porción (8 Onz.)} \end{array}$$

Donde:

y : gramos de ácido ascórbico por porción de jugo (8 Onz.)



## ANEXO 5.

## Certificado de análisis del Acido Ascórbico

Droguería EL SALVADOR **Gibson**

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

*Ascorbic Acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) EP/BP/USP/DAB/FCC*

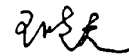
BATCH NUMBER	DY 517492	MANUFACTURE DATE	Nov.25.2000
		TEST DATE	Nov.26.2000
QUANTITY		EXPIRATION DATE	Nov.24.2003

Analysis Items		Specifications	Analysis Results
1.	Characteristics	White crystals or crystalline powder	Meets the requirements
2.	Identification	Positive	Positive
3.	Clarity of Solution	Clear	Clear
4.	Colour of Solution	≤BY <sub>7</sub>	<BY <sub>7</sub>
5.	Melting Point (°C)	191 ~ 192	191
6.	Assay (%)	99.0 ~ 100.5	99.86
7.	Acidity (pH)	2.2 ~ 2.5	2.36
8.	Residue on Ignition (%)	≤0.1	0.02
9.	Specific Rotation (°)	+20.5 ~ +21.5	+20.65
10.	Heavy Metals (%)	≤0.0003	<0.0003
11.	Oxalic Acid (%)	≤0.2	<0.2
12.	Copper (%)	≤0.0005	<0.0005
13.	Iron (%)	≤0.0002	<0.0002
14.	Organic Volatile Impurities	Meets USP 24 stipulation	Meets the requirements

, certify that this batch of Ascorbic Acid meets the requirements of European Pharmacopoeia 3rd, British Pharmacopoeia 1998, United States Pharmacopoeia 24, German Pharmacopoeia 10 and FCC4.

Analysts

Supervisor



Approved



## ANEXO 6.

## Tabla de densidades del agua a diferentes temperaturas

.....  
**TABLE 2 - 6**    Density of water  
 .....

Temperature (°C)	Density of water (g/mL)	Volume of 1 g of water (mL)	
		At temperature shown <sup>a</sup>	Corrected to 20°C <sup>b</sup>
0	0.999 842 5	—	—
4	975 0	—	—
5	966 8	—	—
10	702 6	1.001 4	1.001 5
11	608 4	1.001 5	1.001 6
12	500 4	1.001 6	1.001 7
13	380 1	1.001 7	1.001 8
14	247 4	1.001 8	1.001 9
15	102 6	1.002 0	1.002 0
16	0.998 946 0	1.002 1	1.002 1
17	777 9	1.002 3	1.002 3
18	598 6	1.002 5	1.002 5
19	408 2	1.002 7	1.002 7
20	207 1	1.002 9	1.002 9
21	0.997 995 5	1.003 1	1.003 1
22	773 5	1.003 3	1.003 3
23	541 5	1.003 5	1.003 5
24	299 5	1.003 8	1.003 8
25	047 9	1.004 0	1.004 0
26	0.996 786 7	1.004 3	1.004 2
27	516 2	1.004 6	1.004 5
28	236 5	1.004 8	1.004 7
29	0.995 947 8	1.005 1	1.005 0
30	650 2	1.005 4	1.005 3
35	0.994 034 9	—	—
37	0.993 331 6	—	—
40	0.992 218 7	—	—
100	0.958 366 5	—	—

- a. Corrected for buoyancy with Equation 2-1, using 0.001 2 g/mL air density and density of weights = 8.0 g/mL.  
 b. Corrected for expansion of borosilicate glass (0.001 0% per degree Celsius).

## ANEXO 7.

### Manual de laboratorio

---

# Microscale Laboratory Techniques

McMaster University - Chem2O06 Lab Manual

1997/98

---

Traditionally, experiments in organic chemistry are carried out on a **macroscale** level, employing quantities of chemicals on the order of 5-100 g, using glassware designed to contain between 25 and 500 mL of liquids. For quantities of materials in the 0.005-0.5 gram range, one employs different, "**microscale**" techniques and equipment in order to carry out the various standard organic laboratory operations. In the following, the student is introduced to the special equipment used in microscale experiments, as well as the somewhat different methods which are used.

---

### Index

[Basic Equipment](#)

[Handling of Liquids](#)

[Handling of Solids](#)

[Carrying out Reactions](#)

[Extractions](#)

[Recrystallization](#)

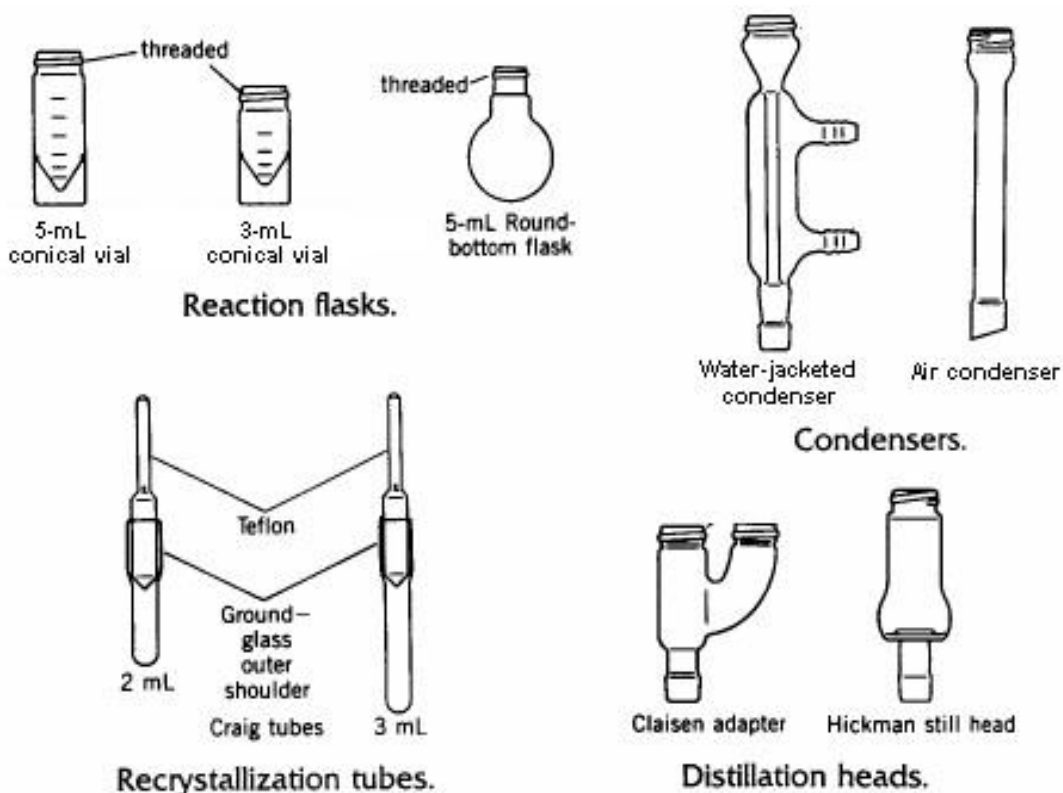
[Distillation](#)

---

## Basic Equipment

The glassware used for microscale experiments is contained in a kit which the student obtains from stores at the beginning of the laboratory period and returns at the end. The Stores technician will ensure that a complete kit is given to the student when it is picked up, and will check it on its return to ensure that it is complete. The student will be charged for missing items.

Some of the contents of the microscale kit are illustrated in the drawing below.



The conical vial is used as a reaction vessel, for extractions, and as a storage container. Its flat base allows it to stand upright on the laboratory bench. The interior of the vial tapers to a narrow bottom, making it possible to withdraw liquids completely from the vial using a disposable Pasteur pipet. The vial has a screw cap which tightens by means of threads cast into the top of the vial. These threads also allow attachment of various other pieces such as a condenser or distillation head, using the double-caps provided in the kit.

---

## Handling of Liquids

Since one rarely works with volumes larger than 2-3 mL, graduated cylinders are rarely used in microscale experiments. Instead, one uses smaller scale volumetric devices such as syringes, automatic pipets, and calibrated disposable Pasteur pipets.

**Automatic Pipets** are commonly used in microscale organic and biochemistry laboratories. They are available in different sizes, and can deliver accurate volumes of *aqueous* solutions from 0.10 mL to 1.0 mL. They were not designed for use with organic solvents and are generally less accurate depending on the liquid. **Automatic pipets are very expensive**, and it is critical that the student handle them carefully and responsibly. Follow the steps outlined below to use an automatic pipet:

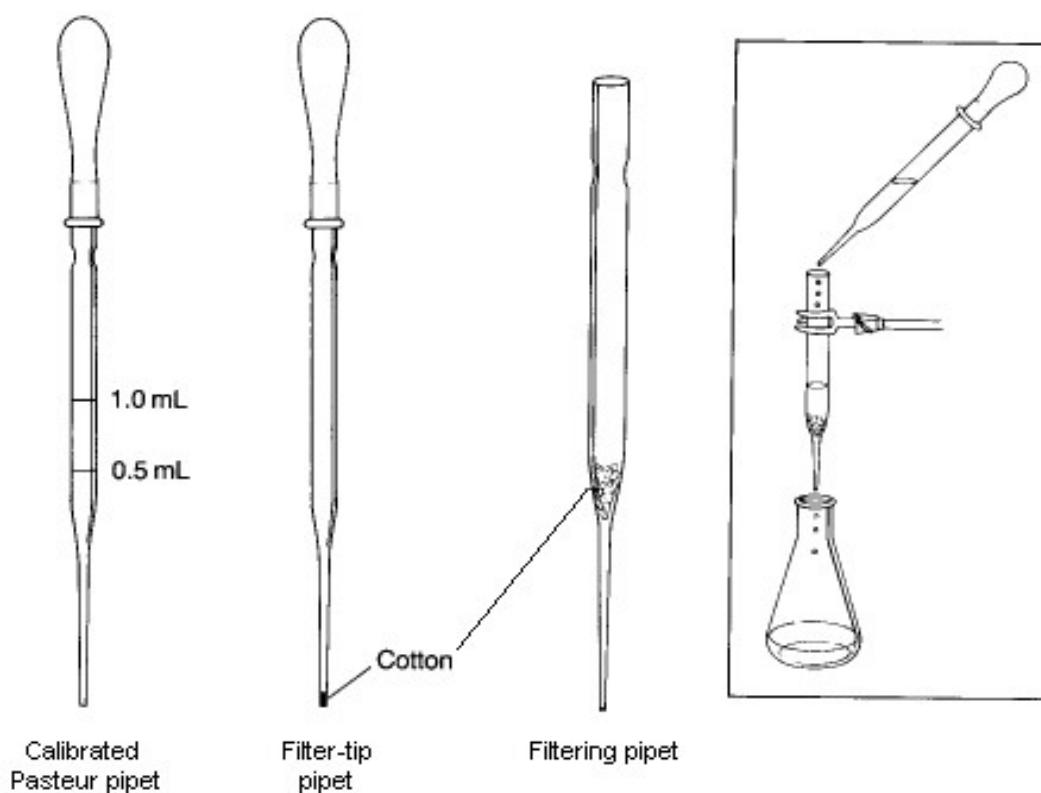
1. Select the desired volume by adjusting the micrometer control on the pipet handle.
2. Place a plastic tip on the pipet. Be certain that the tip is attached securely.
3. Push the plunger down to the first detent position. Do not press the plunger to the second position. (If the plunger is pressed to the second detent, an incorrect volume of liquid will be delivered).
4. Dip the tip of the pipet into the liquid sample. Do not immerse the entire length of the plastic tip in the liquid. It is best to dip the tip only to a depth of about one centimeter.
5. Release the plunger **slowly**. Do not allow the plunger to snap back, or liquid may splash up into the plunger mechanism and ruin the pipet. Furthermore, rapid release of the plunger may cause air bubbles to be drawn into the pipet. At this point the pipet has been filled.
6. Move the pipet to the receiving vessel. Touch the tip of the pipet to an interior wall of the container, and slowly push the plunger down to the first detent. This action will dispense the liquid into the container.
7. Pause one or two seconds and then depress the plunger to its second detent position to expel the last drop of liquid. The action of the plunger may be stiffer in this range than it was up to the first detent.
8. Withdraw the pipet from the receiver. If the pipet is to be used with a different liquid, remove the pipet tip and discard it.

**Syringes** are especially useful when anhydrous conditions must be maintained during an experiment. The needle can be inserted through a rubber septum sealing the reaction vessel, and the liquid added to the reaction mixture. We use plastic (polyethylene) syringes which, although they are called "disposable", can be cleaned and re-used. While the polyethylene barrels are impervious to most solvents, the plungers are made of a less inert material; thus, these syringes cannot be used with . To fill the syringe, insert the needle into the liquid and draw in the required volume. Withdraw the syringe and pull the barrel back ever so slightly to draw any liquid remaining in the needle into the syringe.

**Disposable Pasteur pipets** are used for dispensing small quantities of liquids, as filtration devices, and as columns for small-scale column chromatography. Although

they are considered disposable, you should be able to clean them for reuse as long as the tip remains unchipped.

Pasteur pipets may be calibrated for use in operations where the volume does not need to be known precisely, such as for measurement of solvents need for extraction and for washing a solid obtained following crystallization. To calibrate a Pasteur pipet, weigh 0.5 g (0.5 mL) of water into a small test tube on a balance. Attach a rubber bulb to a short Pasteur pipet. Squeeze the rubber bulb before inserting the tip of the pipet into the water. Try to control how much you depress the bulb so that, when the pipet is placed into the water and the bulb is completely released, only the desired amount of liquid is drawn into the pipet. When the water has been drawn up, place a mark with an indelible marking pen at the position of the meniscus. A more durable mark can be made by scoring the pipet with a file. Repeat this procedure with 1.0 g of water, and make a 1-mL mark on the same pipet.



A **Filtering Pipet** is used to remove solid impurities from a liquid with a volume less than 10-mL. To prepare it, a small piece of cotton is inserted into the top of a Pasteur pipet and pushed down to the beginning of the lower constriction in the pipet. It is important that enough cotton is used to collect all the solid being filtered; however, the amount used should not be so large that the flow rate through the pipet is significantly restricted. The cotton plug can be pushed down with a long thin object such as a glass stirring rod or a wooden applicator stick. In some cases, such as when filtering a strongly acidic mixture or when performing a very rapid filtration, it may be better to use glass wool in place of the cotton, even though it is not quite as good as a filtering aid. To conduct a filtration, the filtering pipet is clamped so that the filtrate will drain into an appropriate container. The mixture to be filtered is transferred

to the filtering pipet with another Pasteur pipet. If the volume of the mixture being filtered is less than 1-2 mL, you should rinse the filter and plug with a small amount of solvent after the last of the filtrate has passed through the filter. If desired, the rate of filtration can be increased by gently applying pressure to the top of the pipet using a pipet bulb.

A **Filter-tip Pipet** is useful for transferring volatile solvents during extractions and in filtering very small amounts of solid impurities from solutions. It is made by loosely shaping a tiny piece of cotton into a ball, and pushing it to the bottom of the pipet using a wire with a diameter slightly smaller than the inside diameter of the narrow end of the pipet. If it is difficult to push the cotton into the tip, you've probably used too much cotton. To use the filter-tip pipet, simply draw the mixture to be filtered into the pipet using a pipet bulb and then expelling it. With this procedure, small amounts of solid will be captured by the cotton.

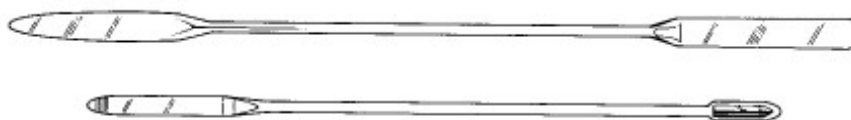
---

## Handling of Solids

Microscale experiments involve quantities on the order of 200-300 mg at most, and it is thus important to be able to weigh solid substances to the nearest milligram. This requires use of a sensitive top-loading balance protected against drafts with a shield, or an analytical balance.

All weighings must be made into a previously weighed ("**tared**") container. The tare weight is then subtracted from the total weight of container plus sample to give the weight of the sample.

Solid samples are manipulated using **microspatulas** similar to those shown below. The larger style is more useful when relatively large quantities of solid must be dispensed.



Microspatulas

---

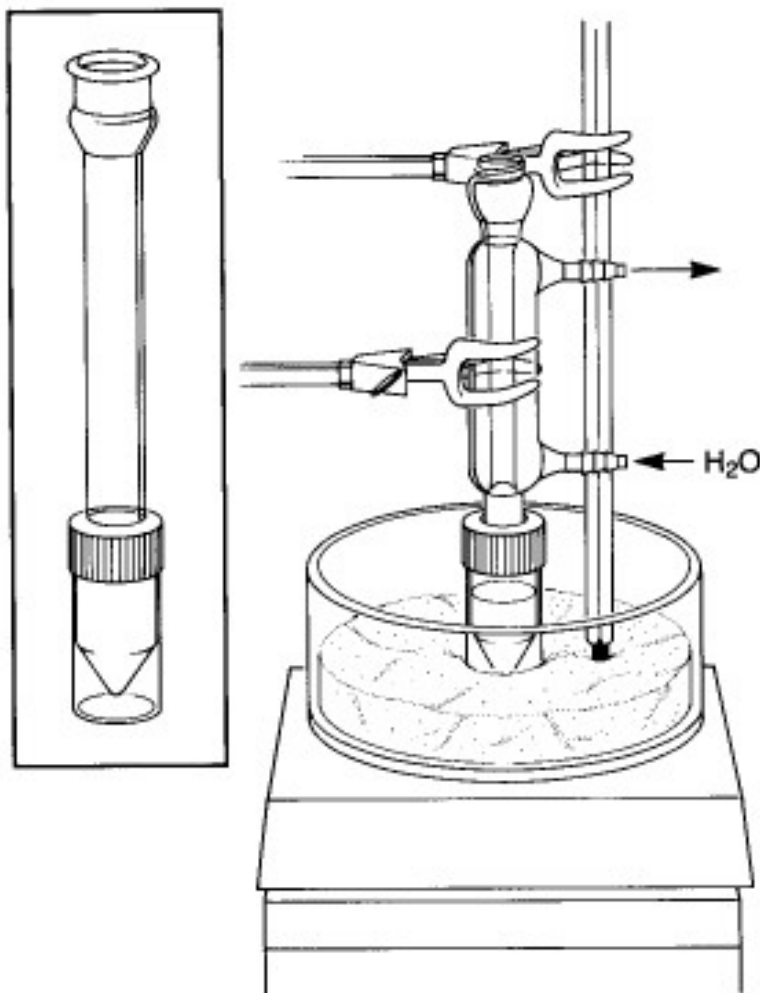
## Carrying out Reactions

A typical assembly for heating a reaction mixture under reflux is shown at the left. While an air condenser is adequate for most applications, a water-jacketed condenser is also supplied, for cases where the solvent is very volatile or where the ambient air temperature is very high. A "spin vane" might also be included for magnetic stirring of the reaction mixture - this is a triangular device coated with teflon, which is shaped to fit the bottom of the conical flask.

Note that the apparatus is clamped at the condenser rather than at the flask, as one would do for a macroscale experiment using conventional ground-glass joint glassware. The apparatus can be clamped in this way because of the screw-cap connection between the condenser and reaction vial, which prevents the connection from falling apart.

Heating is provided by a sandbath atop a magnetic stirrer/heater. A thermometer should be clamped in contact with the sand so as to allow monitoring of the bath temperature. The bath contains slightly more than 1 cm of sand - it is important to have enough to ensure good thermal contact with the reaction vial, but not so much that it is difficult to see the contents.

Reflux apparatus using a water-jacketed condenser (the inset shows an alternative assembly, using an air condenser).



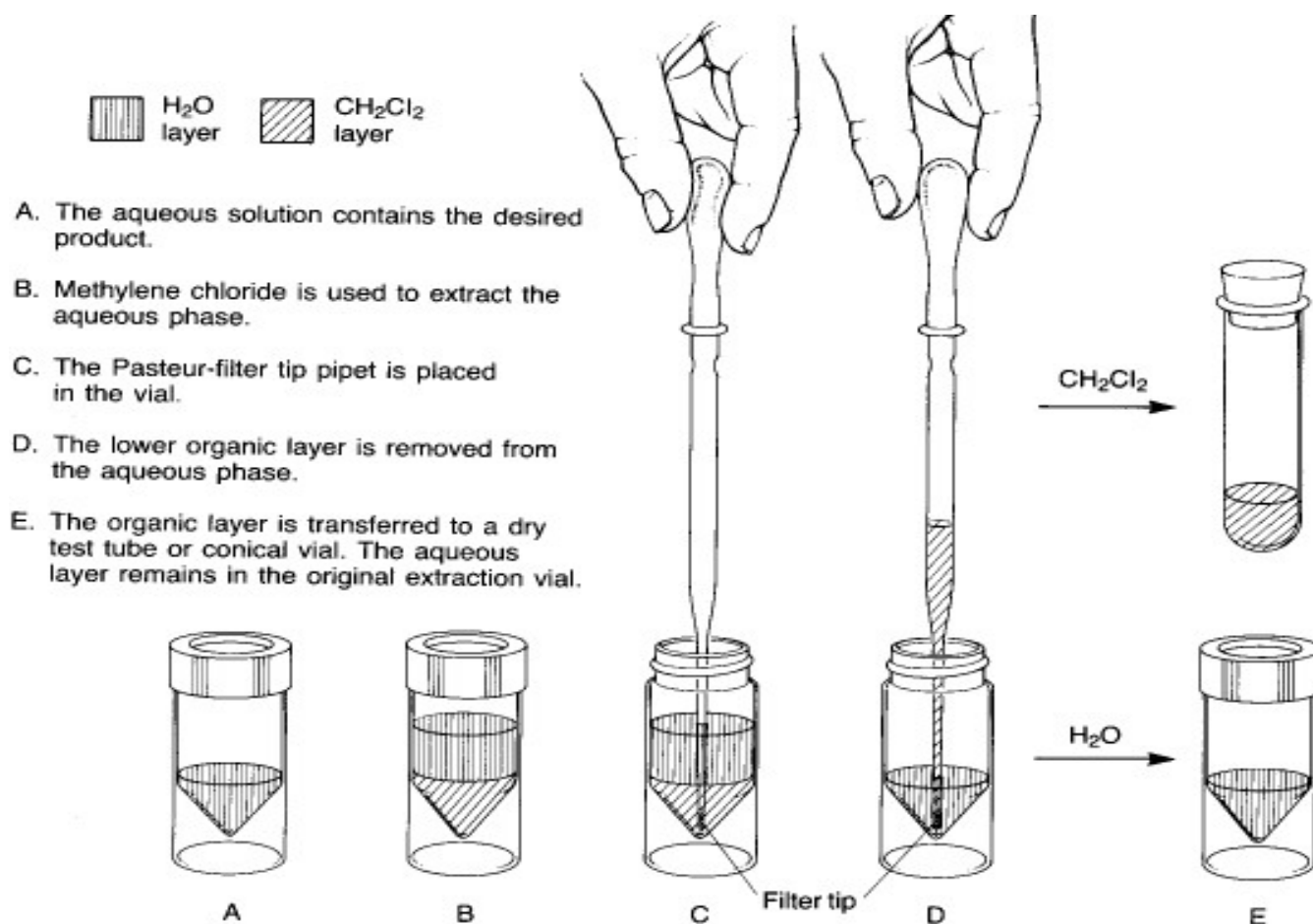


## Extractions

In microscale experiments, the conical reaction vial is the glassware item used for extractions. The two immiscible liquid layers are placed in the vial, and the top is sealed with a cap and a Teflon insert (with the Teflon side toward the inside of the vial). The vial is shaken to provide thorough mixing between the two liquid phases. As the shaking continues, the vial is vented periodically by loosening the cap and then tightening it again. After about 5-10 seconds of shaking, the cap is loosened to vent the vial, retightened, and the vial is allowed to stand upright in a beaker until the two liquid layers separate completely.

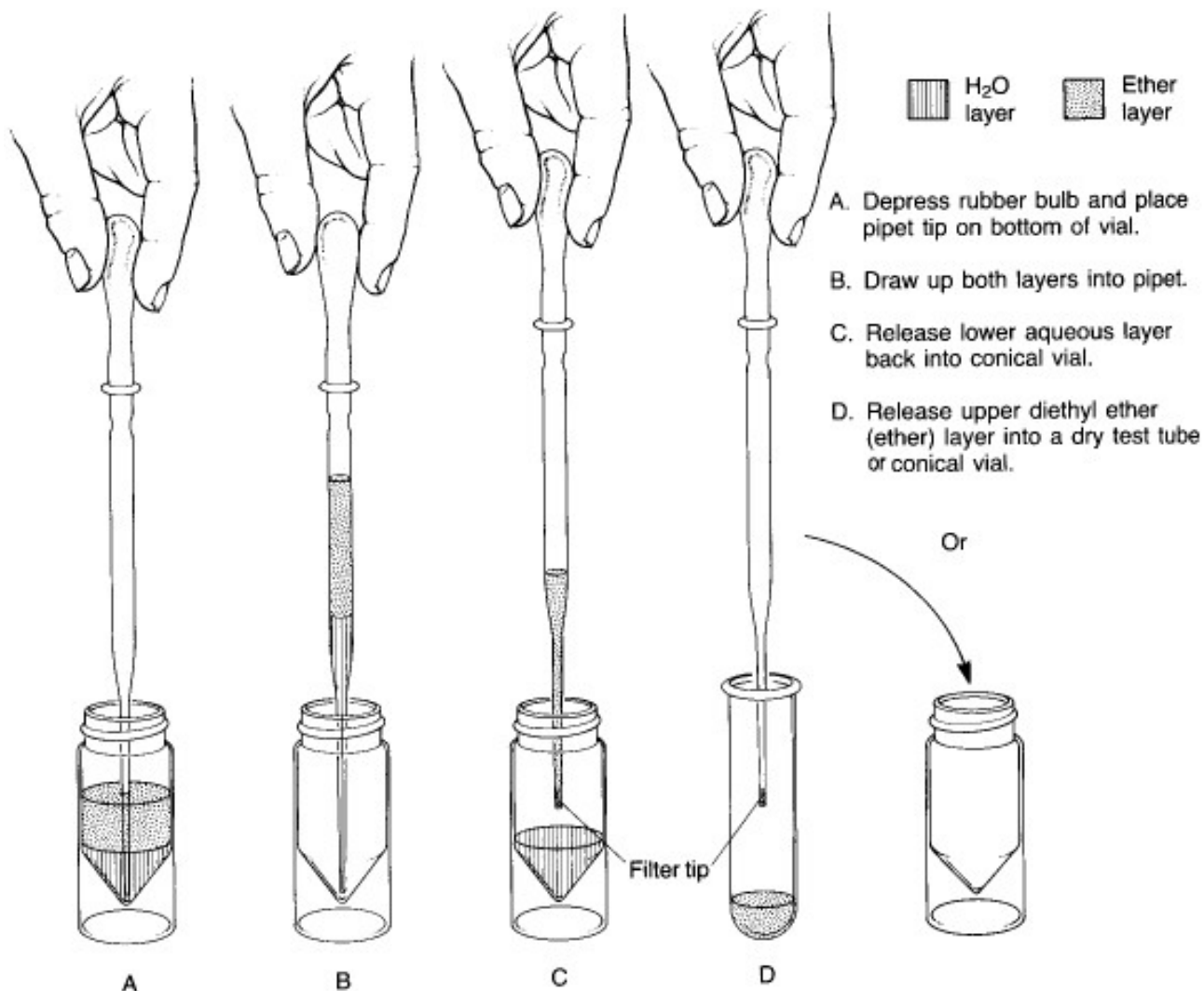
Two basic procedures are possible, depending on whether the solvent being used to extract the desired product is heavier or lighter than water.

**Method A** is employed for extractions where the lower layer is a heavy solvent such as **dichloromethane**:



**Method A - solvent heavier than water**

**Method B** is employed for extraction with a solvent which is lighter than water, such as **diethyl ether**. Note that in this technique, one draws both phases into the pipet and then returns the heavy (aqueous) phase to the conical vial. Ether is so volatile that it is often difficult to hold it in the pipet. Use of a filter-tip pipet for this procedure will help prevent the volatile organic layer from squirting out in an uncontrolled way.



**Method B - solvent lighter than water**

---

## Recrystallizations

Recrystallizations can be carried out using a conical reaction vial and conventional vacuum filtration to collect the crystals on a small filter paper, or in a **Craig tube**, which is a device designed specifically for recrystallization of very small quantities of materials.

In recrystallizations with a conical reaction vial, the conical vial simply takes the place of the Erlenmeyer flask used for macroscale recrystallizations. The isolation of the crystals can be done in a number of ways depending on their form:

- (i) Once crystallization is complete, the mother liquors and crystals are vacuum-filtered through a small Hirsch funnel. Most commonly, the material is transferred to the filter by pouring, using a microspatula to help transfer the crystals from the vial to the filter. In cases where the crystals are fairly small and fluffy, it may be more convenient to draw the entire mixture of crystals + mother liquors into a Pasteur pipet and transfer them to the Hirsch funnel that way.
- (ii) If the crystals adhere to the side of the flask, then filtration is unnecessary. Simply use a filter-tip pipet to remove the mother liquors and transfer them to another flask. Fresh, cold solvent is added to wash the crystals, and this is then removed with the pipet in the same way. The crystals are then dried using a very light stream of air or nitrogen, but care must be taken to ensure that the stream is light enough that the crystals don't get blown out of the vial.

### Craig tube Recrystallizations

Craig tubes are particularly useful for recrystallizing amounts of solid less than ~100 mg, the main advantage being that it minimizes the number of transfers of solid material and thus maximizes the yield of crystals. The separation of the crystals from the mother liquor with the Craig tube is very efficient, and little time is required for drying the crystals. The steps involved are fundamentally the same as those performed in macroscale crystallizations with an Erlenmeyer flask and a Hirsch funnel:

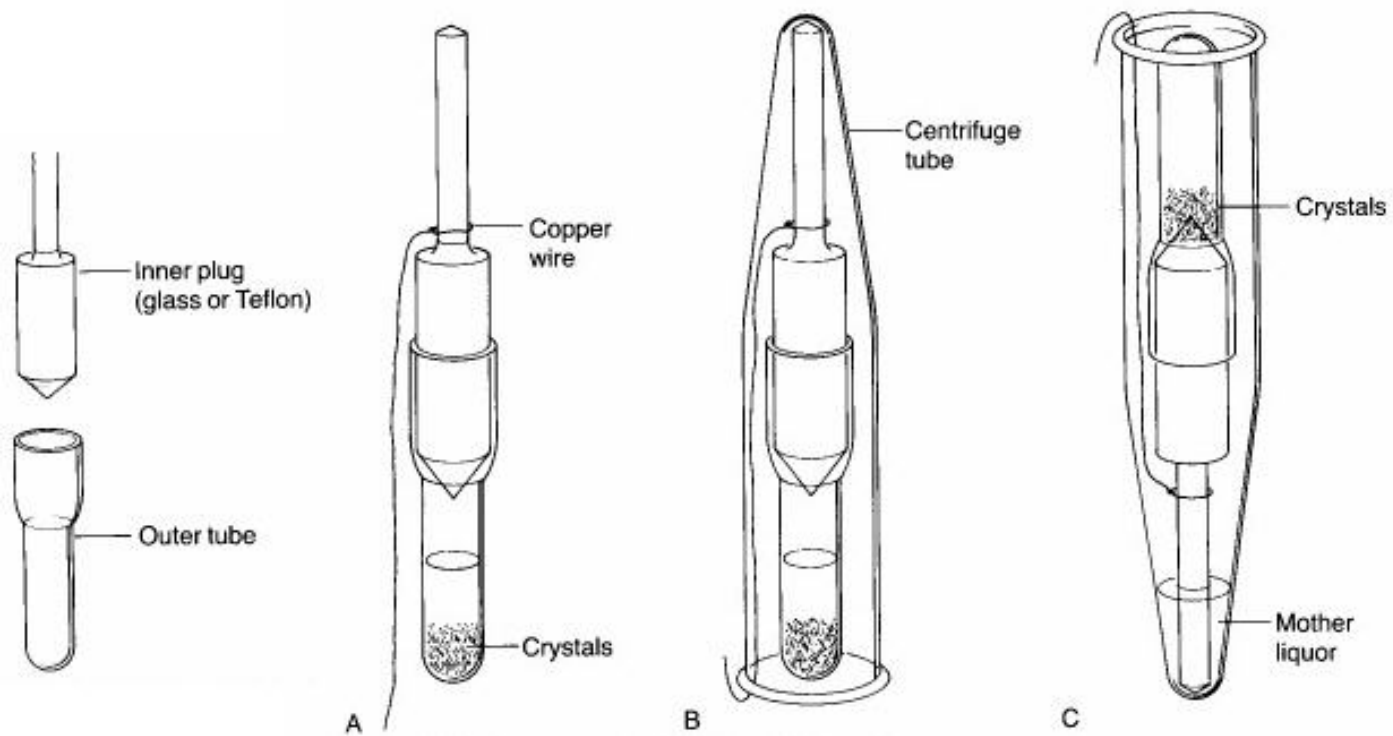
**Step 1.** In crystallizations where a filtration step is not required in order to remove insoluble impurities such as dirt or activated charcoal, this step can be done directly in the Craig tube; otherwise, a small test tube is used. The solid is placed in the Craig tube and the appropriate solvent is heated to boiling in a test tube placed in a sand bath. Several drops of hot solvent is added to the Craig tube, which is then heated in the sand bath while stirring continuously with a microspatula using a twirling motion. This helps dissolve the solute and prevent the boiling liquid from bumping. Additional portions of hot solvent are added until the solid is completely dissolved. Do not add too much solvent, in order to maximize the yield.

**Step 2.** When a hot filtration is necessary, the solid should be dissolved as much as possible in a test tube as described above. Alternatively, the solid can be dissolved in the Craig tube and the liquid transferred to the test tube using a Pasteur pipet preheated with hot solvent. To draw the liquid into the pipet, expel the air from the pipet and then place the end of the pipet on the bottom of the tube, being careful not to trap any solid in the pipet. The small space between the pipet and the bottom of the tube should allow you to draw up the liquid without removing any solid. Rinse the Craig tube with a few drops of hot solvent, and then add these to the test tube. This procedure serves to perform a rough pre-filtration to remove larger pieces of solid. The Craig tube is then washed and dried.

**Step 3.** The test tube containing the mixture is then heated in the sand bath, adding 5-10 drops of solvent to ensure that premature crystallization doesn't occur during the filtration step. To filter the mixture, take up the mixture in a filter tip pipet which has been preheated with hot solvent, and quickly transfer the liquid to the clean Craig tube. Passing the liquid through the cotton plug in the filter-tip pipet should remove the solid impurities. **If this is unsuccessful**, it may be necessary to add more solvent to prevent crystallization and filter the mixture through a filtering pipet. In either case, once the filtered solution has been returned to the Craig tube, it is necessary to evaporate some solvent until the solution is saturated near the boiling point of the liquid. This is best done by placing the Craig tube in the sand bath, and boiling the solution while rapidly twirling the solution with a microspatula. When a trace of solid material coating the spatula just above the level of the liquid is observed, the solution is near saturation and evaporation should be stopped.

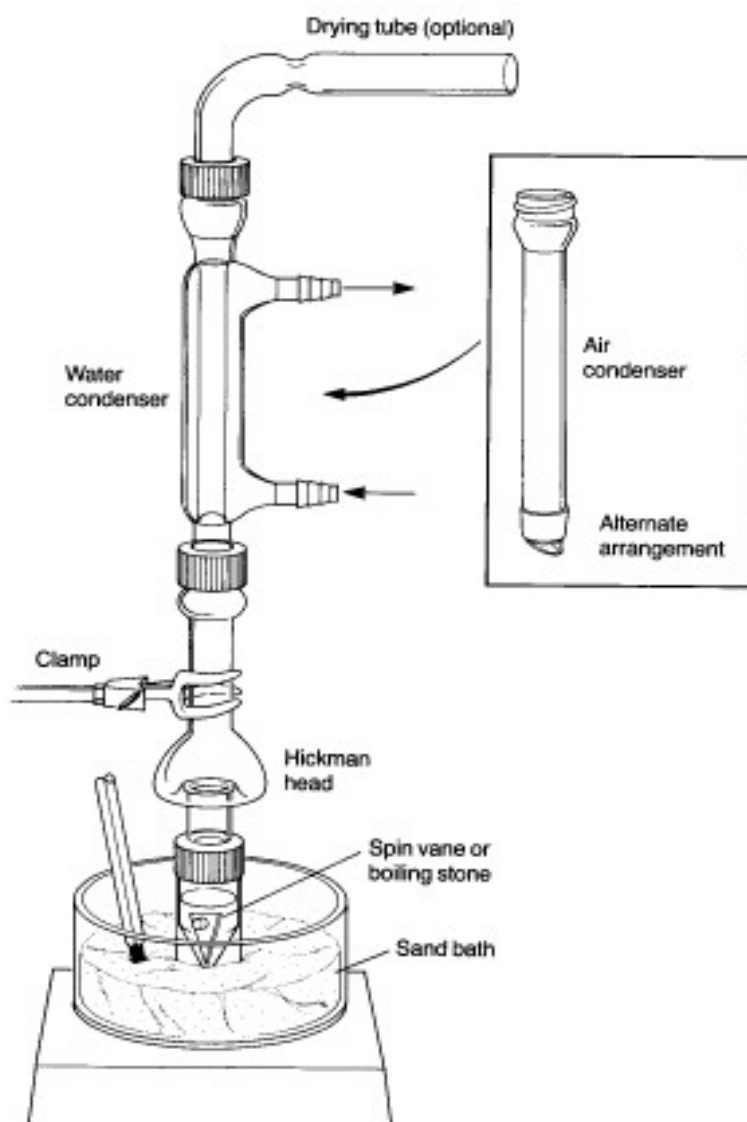
**Step 4.** The hot solution is cooled slowly in the Craig tube to room temperature. This is done by inserting the inner plug into the outer part of the Craig tube, and then placing the whole thing into a 10-mL Erlenmeyer flask. This provides some insulation to slow the cooling rate. The cooling rate can be slowed even further by first filling the Erlenmeyer flask with ~8 mL of hot water at a temperature below the boiling point of the solvent (be careful not to put so much water in the Erlenmeyer that the Craig tube floats). The Erlenmeyer flask containing the Craig tube is then placed on a few layers of paper and left alone to cool to room temperature. Once crystallization at room temperature is complete, the Craig tube is then placed in an ice-water bath to maximize the yield.

**Step 5.** Once crystallization is complete, a 3" piece of copper wire is wrapped around the barrel of the inner plug of the Craig tube (see 'A' below), and a Centrifuge tube is placed over top of it. After bending the copper wire back up the side of the centrifuge tube so that the Craig tube is held securely inside it (see 'B' below), the centrifuge tube is inverted (see 'C' below). The solvent should seep out of the Craig tube, leaving the crystals behind. The tube is then centrifuged for a few minutes to complete the separation of the mother liquors from the crystals. Using a microspatula, the crystals are then scraped off the end of the inner plug or from inside the Craig tube onto a watch glass or piece of paper. Minimal drying will be necessary.



## Distillation

The key to successful microscale distillations is in avoiding long distillation paths, since this is the main factor leading to loss of material during distillation. Short-path microscale distillations are carried out using the **Hickman distillation head** as the receiving device for the distilled liquid. Two types of Hickman head, 'ported' and 'unported', are shown in the figure below. The complete apparatus consists of a flask or vial containing the liquid and a magnetic spin vane or boiling stone, attached to the bottom joint of the Hickman head. If desired, a condenser is attached to the top joint. A thermometer can be suspended down the middle in order to record the distilling temperature, with the bottom of the thermometer in the lower part of the Hickman head just below the circular well. The vapours of the heated liquid rise upward and are cooled and condensed on either the inside walls of the Hickman head or on the walls of the condenser. As liquid drains downward, it collects in the circular well at the bottom of the still. The well can contain as much as 2-mL of liquid.



Collection of fractions is easiest with the ported Hickman head; the port is opened and the liquid in the well removed with a Pasteur pipet (see 'C'). With the unported head, the liquid is drawn out from the top with a Pasteur pipet (see 'A'). If a condenser or internal thermometer is used, the distilling apparatus must be partially disassembled in order to do this. In some stills the inner diameter of the head is so small that it is difficult to reach in at an angle with the pipet and make contact with the liquid. This problem may be remedied by bending the tip of the pipet slightly in a flame.

Once removed, the liquid is transferred to a small vial and capped with a Teflon-sealed cap.

