

## **II. Prácticas de laboratorio**

## **Práctica 1**

### **Determinación de humedad y materia grasa en un alimento**

#### **1. Determinación de la humedad.**

**Fundamento:** en esta práctica se aplicará la forma más simple y rápida de determinar la humedad en alimentos, que consiste en someter la muestra a un proceso de secado mediante calentamiento a una temperatura suficiente como para que se pierda el agua por evaporación hasta peso constante. La diferencia de masas antes y después del secado permite la estimación del contenido de agua en la muestra (método indirecto). Sin embargo este método no permite diferenciar entre el agua y otros componentes presentes en la muestra y que también se volatilicen en las condiciones de trabajo. Además, la calefacción puede dar lugar a otros cambios químicos en la muestra (oxidaciones, por ejemplo). Por ello, una determinación más precisa del contenido en agua requeriría la adsorción del agua desprendida sobre un adsorbente selectivo y posterior pesada de éste (método directo).

#### **Procedimiento:**

1. Tarado de las cápsulas de porcelana. Se introducen en la estufa tres cápsulas de porcelana limpias durante unos 15 min. A continuación se extraen y se enfrían en desecador durante otros 15 min. Finalmente se pesan en la balanza analítica.
2. Secado. Se molturan por triplicado en sendos morteros de vidrio unos 2.5-3 g de muestra (pesados en granatario) con el fin de aumentar su superficie específica y facilitar su secado. Se pesan con exactitud (balanza analítica) alrededor de 2 g de la muestra triturada en las cápsulas de porcelana previamente pesadas. Se introducen entonces las cápsulas en la estufa a 105 °C durante una hora.
3. Pesada. Transcurrido ese tiempo se extraen las cápsulas de la estufa y se dejan en desecador unos 15 min hasta que se enfríen. Se pesan las cápsulas y se introducen nuevamente en la estufa, repitiendo el proceso cuantas veces sea necesario hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de humedad en la muestra se calcula por diferencia de masas.

## 2. Determinación del contenido en materia grasa

El valor comercial de muchos alimentos se establece, entre otros factores, a partir de su contenido en grasa, por lo que esta determinación es de gran interés en muchas industrias alimentarias.

**Fundamento:** Para conocer este parámetro se recurre a un procedimiento de extracción separando la grasa con un disolvente adecuado, y evaporando éste antes de proceder a la pesada del residuo graso obtenido. La extracción en esta práctica se lleva a cabo en un equipo Soxtec, que es una de las versiones comerciales del conocido extractor Soxhlet.

### Procedimiento:

1. Extracción de la grasa. Se pesan con precisión (balanza) porciones de alrededor de 1 g del residuo obtenido tras secado en el apartado anterior, y se introducen en sendos cartuchos de celulosa. Se colocan los cartuchos en el Soxtec, habiendo pesado antes los recipientes de aluminio anodizado en los que se va a recoger la materia grasa; en cada recipiente se coloca además un trocito de plato poroso. Se añaden 50 mL de éter de petróleo, y se acondiciona el montaje para que el éter recircule durante 15 min, ajustando la temperatura del baño de aceite a 100 °C.
2. Pesada. Una vez finalizado el proceso de extracción se retiran los recipientes con la grasa y se introducen en la estufa a 105 °C durante 10 min para eliminar todos los restos de disolvente. Se extraen los recipientes de la estufa y se dejan en el desecador durante otros 15 min para enfriar. Finalmente se pesan los recipientes con la grasa.

### Cuestiones:

1. Señala las posibles fuentes de error en la determinación de la humedad en la muestra analizada.
2. Cómo se podría comprobar si la extracción de grasa en la muestra ha sido cuantitativa.
3. Indica las precauciones a adoptar durante la manipulación del éter de petróleo.

## **Práctica 2**

### **Análisis de grasas y aceites: determinación del grado de acidez de un aceite comestible**

**Fundamento:** neutralización de la acidez libre con disolución de NaOH previamente estandarizada frente a ftalato ácido de potasio.

#### **Procedimiento:**

1. Se prepara una disolución de NaOH de concentración aproximada 0.05 M disolviendo la cantidad apropiada de reactivo (pesado en granatario) en un vaso con unos 250 mL de agua. Se agita y se guarda en un frasco de plástico. Se pesan por triplicado y con precisión (balanza analítica) alrededor de 0.050 g de ftalato ácido de potasio ( $PM = 204.22$ ), y se trasvasan a tres erlenmeyers limpios (no hace falta secarlos) con la ayuda de unas gotas de agua destilada. Se agita hasta disolución completa. A continuación se añade fenolftaleína y se valora con la disolución preparada de NaOH, que será añadida desde una bureta de 10 mL. La bureta debe enjuagarse primero con agua destilada y después con la disolución de valorante, todo ello antes de iniciar la valoración.
2. Valoración de la muestra: en un erlenmeyer de 100 mL limpio y seco se introducen unos 6 g de muestra problema pesados con precisión. Para ello se ajusta la balanza a cero, y a continuación se introduce el erlenmeyer, anotando el peso. Seguidamente se extrae el erlenmeyer de la balanza y con ayuda de un cuentagotas se introduce la muestra, volviendo a pesar. La diferencia de lecturas corresponderá a la cantidad de muestra tomada. Se añaden a continuación al erlenmeyer unos 50 mL de etanol para disolución de la muestra junto con unas cinco gotas de disolución de fenolftaleína, y se valora con la disolución de NaOH. El grado de acidez se expresa como g de ácido oleico por 100 g de muestra.

**Recogida de residuos:** los residuos de la valoración y la muestra no consumida deben recogerse en los recipientes dispuestos a tal efecto.

#### **Cuestiones:**

1. Por qué es necesario adicionar etanol a la muestra antes de proceder a valorar.
2. Por qué el resultado del análisis se refiere a la cantidad de ácido oleico.
3. Explica si podría utilizarse un potenciómetro para la detección del punto final.

### Práctica 3

#### Determinación de agua en leche en polvo mediante el método de Karl-Fischer

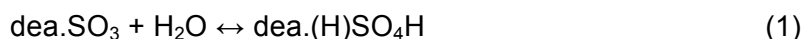
**Fundamento:** el método de Karl-Fischer se basa en la reacción estequiométrica entre el SO<sub>2</sub> y el I<sub>2</sub> en presencia de agua:



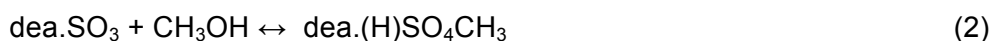
Para fijar los reaccionantes y los productos de la reacción se trabaja en presencia de dietanolamina. Los compuestos están en el medio de reacción como complejos de dietanolamina (NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>, dea):



El complejo dea.SO<sub>3</sub> formado podría consumir un exceso adicional de H<sub>2</sub>O de acuerdo con la siguiente reacción:



Para evitarlo se trabaja en presencia de un gran exceso de metanol:



En definitiva, el procedimiento de Karl-Fischer implica el consumo de un mol de I<sub>2</sub> y un mol de SO<sub>2</sub> por cada mol de agua presente en el medio de reacción. En la práctica, se trabaja en exceso de dietanolamina, metanol y SO<sub>2</sub>, de forma que es la cantidad de I<sub>2</sub> añadida la que permite determinar la cantidad de agua. Por su parte el metanol se usa como disolvente tanto para el reactivo como para la muestra, favoreciendo además que la transformación del dea.SO<sub>3</sub> formado transcurra según la reacción (2) en vez de a través de (1).

La detección del punto final puede realizarse mediante cualquiera de estas técnicas:

- visual, hasta que el medio de reacción adquiere un tono pardo-rojizo, ya que el reactivo valorante es de ese color, si bien esta metodología solo es útil en el caso de muestras incoloras o muy débilmente coloreadas
- espectrofotométrico, utilizando el vaso de valoración como una cubeta sobre la

que se hace incidir una radiación de 525 nm (máximo de absorción del  $I_2$ )

- biamperométrica, que es la que se utilizará en esta experiencia, y que aprovecha el hecho de que con el primer exceso de  $I_2$  se produce una circulación de corriente entre dos electrodos sumergidos en la celda de valoración y entre los que se aplica una tensión adecuada. En presencia de agua la corriente es prácticamente inapreciable. La valoración se efectúa en condiciones óptimas cuando se añade un exceso de reactivo de Karl-Fisher ( $I_2$ ), y después se valora por retroceso con disolución estandarizada de agua en metanol. En este caso, la corriente indicada por el galvanómetro desciende bruscamente a cero al llegar al punto final.

### Observaciones:

- Es necesario secar bien el material de vidrio y preservar las disoluciones del contacto con el aire.
- Es necesario evitar el contacto con el metanol, pues se absorbe a través de la piel. Para ello ha que usar guantes durante su manipulación y evitar respirar su vapor.

### Procedimiento:

1. Preparación de la disolución patrón de agua (5 mg/mL). Se enjuaga un aforado de 250 mL, limpio y con la menor cantidad de agua, con un poco de metanol anhidro (el metanol se vierte en el bidón de desechos dispuesto al efecto). Seguidamente se introducen otros 20-25 mL de metanol, se tapa el aforado (es necesario manipular el tapón con guantes para no aumentar su masa) y se pesa en la balanza analítica. A continuación se retira el tapón y se añade alrededor de 1.2 g de agua destilada utilizando un cuentagotas y un vaso con agua. Se tapa nuevamente el aforado, y se establece por diferencia la masa de agua añadida (con precisión de 0.1 mg). Se enrasa el aforado con metanol anhidro utilizando primero el dosificador, y después un vaso y un cuentagotas perfectamente secos. Finalmente la disolución preparada se introduce en el frasco seco preparado al efecto.
2. Estandarización del reactivo de Karl-Fischer. Se enjuaga primero la bureta correspondiente con la disolución patrón de agua (bureta 1). La otra bureta se deja cargada con el reactivo (bureta 2). Sin levantar la tapa del vaso de reacción y a través de la boca con tapón se vierten unos 25 mL de metanol anhidro. Mediante el programa la bureta 2 se dispensan 5 mL del reactivo de Karl-Fischer. Se valora con la disolución de agua, anotando el volumen en el punto final. La estandarización debe hacerse por triplicado.
3. Valoración de la muestra. Se deposita el contenido del vaso al bidón de

residuos y se seca el vaso con un papel. Se coloca entonces el vaso sobre el agitador después de taparlo presionando con cuidado. Se pesan en un pesa-sustancias con precisión alrededor de 0.3 g de muestra. La muestra se introduce en el vaso a través del orificio de la tapa, acabándola de arrastrar con unos 25 mL de metanol anhidro. Con la bureta 2 se vierten 10 mL del reactivo de Karl-Fischer. Se valora el exceso de reactivo con la disolución patrón de agua, efectuando la valoración por triplicado. No es necesario que la muestra se disuelva, ya que en parte el agua contenida en la muestra es extraída por el disolvente, y además el reactivo penetra en la muestra dispersa, reaccionando con toda el agua disponible.

**Recogida de residuos:** una vez realizados los cálculos y tras haber comprobado que los resultados entran en el intervalo posible, se deposita la disolución de agua sobrante en el recipiente dispuesto a tal efecto.

### Cuestiones

1. Por qué es necesario estandarizar la disolución de Karl-Fischer antes de proceder a la valoración de la muestra.
2. Explica cómo se detectaría el punto final si en vez de llevar a cabo una valoración por retroceso se valorase la muestra directamente.
3. Considerando el resultado del análisis, calcula el volumen de agua recogido si el análisis se hubiese llevado a cabo mediante destilación azeotrópica. ¿Sería viable dicha determinación?

## Práctica 4

### Determinación de mezclas de cafeína, ácido benzoico y aspartamo en refrescos por cromatografía líquida

La composición de algunas bebidas refrescantes incluye diversos compuestos, básicamente extractos vegetales, y aditivos conservantes, edulcorantes, colorantes, etc. Aunque para la determinación de algunos de ellos se dispone de métodos rápidos y selectivos, en general es más útil aplicar un método separativo ya que de esta forma es posible la cuantificación simultánea de varios compuestos. En este sentido la técnica preferida es la cromatografía líquida, pues requiere un tratamiento mínimo las muestras, que por lo general se limita a una filtración y/o dilución. Por tanto, la determinación de aditivos por cromatografía líquida presenta un marcado interés analítico, habiéndose elegido en esta práctica la resolución y cuantificación de cafeína, un estimulante, ácido benzoico, que se emplea como conservante, y aspartato, un edulcorante artificial.

**Fundamento:** los tres aditivos seleccionados pueden ser separados mediante cromatografía líquida en su modalidad de fase inversa, pues se trata de compuestos orgánicos de baja-media polaridad. En ese caso se emplea columna estándar de tipo ODS (125 mm x 4.6 mm d.i., 5  $\mu$ m), y una fase hidro-orgánica, en este caso una mezcla metanol/agua acidulada con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH=3) (45:55, v/v). Los tres compuestos además presentan absorbancias adecuadas en el ultravioleta, siendo posible su detección simultánea con adecuada sensibilidad a 218 nm.

#### Procedimiento:

1. Preparación de la fase móvil y acondicionamiento del cromatógrafo. Se introducen en una botella perfectamente limpia unos 250 mL de la fase móvil (ya preparada), y se desgasifica colocando dicha botella en el baño de ultrasonidos durante unos 10 min. Tras retirar del baño de ultrasonidos, se utiliza dicha botella como depósito de fase móvil del cromatógrafo, seleccionando un flujo de 1 mL/min. Previamente la columna debe acondicionarse con metanol también a flujo de 1 mL/min durante otros 10-15 min. Se enciende entonces la lámpara del detector. Mientras se estabiliza el sistema cromatográfico se preparan las disoluciones patrón.
2. Preparación de las disoluciones patrón. En seis matraces aforados de 25 mL se introducen los volúmenes de las disoluciones patrón de cafeína (500 mg/L), ácido benzoico (500 mg/L) y aspartamo (1000 mg/L) indicadas en la siguiente tabla. Se afora con agua destilada, agitando al finalizar y rotulando adecuadamente los matraces.



Matraz	Patrón de cafeína (mL)	Patrón de ácido benzoico (mL)	Patrón de aspartamo (mL)
1	5	-	-
2	-	5	-
3	-	-	5
4	2	2	2
5	3	3	3
6	4	4	4

3. Inyección de las disoluciones patrón. Se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las disoluciones preparadas, comenzando por las disoluciones 1-3, a partir de las cuales se obtienen los tiempos de retención.
4. Análisis de la muestra. Se desgasifica la muestra (un refresco comercial de cola) en baño de ultrasonidos. Se toman por triplicado alícuotas de la muestra de 5 mL, añadiéndole otros 5 mL de agua destilada. Se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de cada disolución de la muestra, midiendo en su caso las áreas de los compuestos de interés, los cuales se habrán identificado a través de los tiempos de retención.
5. Identificación y cuantificación de aditivos en la muestra problema. Una vez que el programa haya cerrado cada fichero, se integran los picos correspondientes a los analitos, anotando en cada caso los tiempos de retención y los valores de área. A partir de los valores de área obtenidos para las disoluciones patrón se calculan las rectas de calibrado correspondientes a cada uno de los aditivos ensayados. Finalmente, se interpolan en las rectas obtenidas los valores de área correspondientes a las muestras, y se calculan las concentraciones de los aditivos identificados. El resultado se expresa como mg de aditivo por cada 100 mL de bebida.

**Recogida de residuos:** al finalizar los ensayos se retira el recipiente con la fase móvil, sustituyéndola por el de metanol. La fase móvil no utilizada debe depositarse en el recipiente dispuesto al efecto.

### Cuestiones:

1. Explica por qué es necesario desgasificar la fase móvil.
2. Indica si podría trabajarse a otra longitud de onda para llevar a cabo la determinación.
3. A partir de los cromatogramas obtenidos para la muestra, indica si se tiene evidencia de la presencia de otros componentes en la misma.

## Práctica 5

### Determinación gravimétrica de níquel en aceros inoxidables

Los aceros inoxidables contienen junto con el elemento mayoritario, el hierro, cantidades variables de níquel y cromo, así como cantidades menores de carbono, fósforo, silicio, azufre y manganeso, entre otros. Los porcentajes relativos de estos elementos determinan las propiedades del acero, por lo que su determinación es de gran importancia en numerosos contextos. En esta práctica se determinará uno de estos elementos, el níquel, a través de un procedimiento gravimétrico.

**Fundamento:** se procede en primer lugar al tratamiento de una pieza de acero inoxidable para su disolución, y posterior precipitación del Ni(II) con el reactivo dimetilglioxima (DMG) en medio amoniacal. El tratamiento del precipitado a 110-120 °C y posterior pesada del mismo permite determinar el níquel de la muestra con adecuada selectividad. La DMG permite la precipitación cuantitativa del níquel, pero en el intervalo de pH adecuado para la precipitación (4-10) puede producirse la precipitación de algunos metales como Fe(III), Cr(III), Al (III) en forma de hidróxidos, lo que se evita añadiendo un agente complejante de éstos como el tartrato o el citrato. Por otra parte, la DMG es poco soluble en agua pero es soluble en etanol, por lo que el reactivo se prepara en etanol. El exceso de reactivo en el medio de reacción debe ser limitado para evitar su coprecipitación. La adición de reactivo se realiza en medio ligeramente ácido y en caliente, aumentando después el pH con disolución de amoníaco. De este modo se forman cristales de mayor tamaño y más fácilmente filtrables al ser menor la sobresaturación alcanzada.

#### Procedimiento:

1. Tratamiento de la muestra. Se coloca la muestra, previamente pesada, en un vaso alto de 250 mL y se añaden al mismo 10 mL de HCl 1:1 y otros 10 mL de HNO<sub>3</sub> también 1:1 (en vitrina). Se calienta hasta completa disolución de la muestra, sin extraer el vaso de la vitrina en ningún momento. Si se observara que el nivel de líquido en el vaso es demasiado bajo, se añaden unos 10 mL de agua destilada. Se deja enfriar y después se trasvasa a un aforado de 50 mL, enrasando con agua destilada.
2. Obtención del precipitado. Se introducen 3 alícuotas de 5 mL del aforado anterior en tres vasos de precipitados altos de 250 mL. Se añaden 3 g de ácido tartárico en cada vaso y a continuación amoníaco 1:1 hasta olor persistente a amoníaco. Si aparece algún precipitado se añade más

amoníaco hasta disolución completa. Se acidula ligeramente con HCl 1:1 (hasta cambio a tonalidad parda). A continuación se calienta suavemente y se añaden 10 mL de disolución etanólica de DMG al 1 %. Esta disolución se prepara disolviendo en un vaso de precipitados aproximadamente 0.5 g de reactivo en 50 mL de etanol. Agitando con una varilla (que no ha de sacarse del vaso en ningún momento) se añade amoníaco concentrado hasta olor persistente. Se mantiene en caliente durante media hora. Todas estas operaciones se realizarán en la vitrina. Finalmente se deja en reposo durante al menos 1 hora. Durante este tiempo se procede a la limpieza y tarado de las placas filtrantes.

3. Limpieza y tarado de las placas. Las placas se lavan pasando (con vacío) unos mL de  $\text{HNO}_3$  1:1 primero, y agua destilada después, cuidando que la limpieza se produzca sobre toda la superficie de la placa. Se rotulan las placas para diferenciarlas y se introducen en la estufa, donde deberán permanecer durante unos 15 min. Transcurrido este tiempo se colocan en el desecador con ayuda de unas pinzas durante otros 10 min. Por último se pesan las placas, manipulándolas con las pinzas hasta que se hayan pesado (después se pueden manipular con las manos).
4. Pesada. Finalmente el precipitado se filtra y se lava con agua tibia hasta que las aguas lavado no den reacción con  $\text{Ag(I)}$ . Se introducen entonces las placas en la estufa. Tras enfriar en desecador se pesan. Una vez obtenida la masa de precipitado se introducen las placas en la disolución nítrica de la vitrina para su limpieza. El resultado se expresa como porcentaje de Ni en el acero analizado.

**Recogida de residuos:** las disoluciones sobrantes deben recogerse en los recipientes dispuestos al efecto.

#### Cuestiones:

1. Explica por qué la disolución de reactivo precipitante se prepara en etanol.
2. ¿Para qué se mantiene el precipitado en reposo antes de su filtración?
3. Qué indica reacción positiva con disolución de  $\text{Ag(I)}$  durante el lavado del precipitado obtenido.

