

Diagrama de fase del efecto lechoso obtenido por espectroscopia UV-Vis con control de temperatura

Experimentos simultáneos con rampa de temperatura mediante el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 y la función multizona del módulo de muestreo Multicell

Autores

Marc-André Gagnon y Claire
Cislak
Agilent Technologies, Inc.

Introducción

Un diagrama de fase es un concepto fundamental en química. Muestra cómo cambia el estado físico de una sustancia en función de dos variables, como la temperatura y la presión o la temperatura y la concentración. Los diagramas de fase se elaboran trazando curvas que representan las condiciones en las que las distintas fases de la materia coexisten en equilibrio. Las líneas de un diagrama de fase representan los límites de fase; por ejemplo, el límite entre una fase sólida y una líquida o entre una fase líquida y una gaseosa. Estos límites indican las condiciones en las que se produce la transición entre fases. Por tanto, el cambio de la variable apropiada en un diagrama de fase concreto para mover un valor de un lado de un límite al otro indica las condiciones necesarias para una transición de fase. El proceso puede ser laborioso, ya que deben realizarse numerosos experimentos para obtener un diagrama de fase completo.

Un diagrama de solubilidad, que se considera un elemento similar a un diagrama de fase, indica cómo se combinan una o varias sustancias con otra sustancia. Un diagrama de solubilidad permite conocer la solubilidad (solutos formando soluciones con solventes en función de la concentración y la temperatura) y la miscibilidad (sustancias que se mezclan para formar una solución homogénea sin precipitación). Los diagramas se basan en las interacciones favorables o desfavorables entre las sustancias químicas que se estén estudiando.

Tanto los diagramas de solubilidad como los diagramas de fase revelan información sobre cómo interactúan físicamente las sustancias químicas entre sí y con el medio ambiente. Por consiguiente, estos estudios son esenciales para comprender los principios de la química.

Dado que se ha demostrado que la espectroscopia UV-Vis resulta adecuada para la caracterización de muestras turbias¹, se empleó esta técnica para estudiar el efecto lechoso. El efecto lechoso describe un tipo de emulsificación que se produce entre el agua y los terpenos de ciertas bebidas alcohólicas, como el ouzo griego o el pastís francés. Por ejemplo, una conocida marca de pastís contiene un terpeno muy hidrófobo, el anetol (Figura 1), que es el responsable del aroma anisado del licor. En su forma pura, el licor tiene una concentración de etanol del 45 % (v/v). Con esta concentración de etanol, las moléculas de anetol son completamente solubles en la mezcla agua/alcohol.

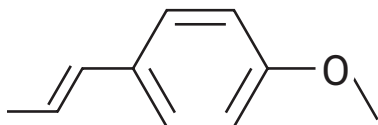


Figura 1. Estructura química del anetol, un terpeno muy hidrófobo presente en algunos tipos de pastís.

El pastís se suele servir con agua y hielo, lo que reduce la concentración de alcohol, a causa de la dilución, y la temperatura de la mezcla. Como resultado, las moléculas de anetol precipitan en la fracción acuosa, haciendo que el color del licor pase de ámbar transparente a amarillo turbio (Figura 2). Aunque el mecanismo que provoca este fenómeno no se comprende por completo, este cambio casi instantáneo fascina tanto a los químicos como al resto de las personas².



Figura 2. Preparación de una bebida típica a base de pastís, donde se aprecia el efecto lechoso. Mediante la combinación de pastís puro (izquierda), agua (en segunda posición por la izquierda) y cubitos de hielo (en segunda posición por la derecha) se obtiene una bebida de color amarillento turbio (derecha).

En este estudio, se evaluó la transición de fase para distintas mezclas agua/etanol; para ello, se midió la magnitud de la dispersión de luz producida por la suspensión de anetol en la mezcla de pastís. Tal como ya se ha demostrado, el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 ofrece capacidades específicas para caracterizar muestras turbias gracias a su exclusivo diseño óptico¹.

Espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500

El espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 es un sistema modular completamente intercambiable que usa una lámpara de xenón (Xe) pulsante como fuente y un doble monocromador Littrow fuera de plano. El ancho de banda espectral (SBW) del monocromador puede ajustarse entre 0,1 y 4,0 nm. La señal de la fuente se envía directamente a todas las cubetas a la vez gracias a la tecnología de fibra óptica.

Cuando se combina el módulo de muestreo Agilent Compact con el motor común UV-Vis Cary 3500, el analista tiene acceso a dos posiciones de la cubeta, mientras que el módulo de muestreo Agilent Multicell ofrece acceso a ocho cubetas.

Los módulos de muestreo Compact Peltier y Multicell Peltier usan un sistema de control de temperatura Peltier refrigerado por aire que permite obtener y mantener una temperatura de entre -5 y 110 °C. El sistema también permite utilizar rampas de temperatura con valores de entre 0,1 y 40 °C/min.

La exclusiva función multizona del módulo de muestreo Multicell posibilita realizar simultáneamente cuatro experimentos con control de temperatura (cuatro pares de muestras y referencias) en zonas independientes. La capacidad multizona mejora sensiblemente la productividad a la hora de elaborar diagramas de fase multipunto.

En este estudio, se combinó el sistema Cary 3500 con el módulo de muestreo Multicell Peltier para realizar estudios simultáneos de cuatro mezclas alcohol/agua diferentes con rampas de temperatura. Para cada conjunto de experimentos, se varió cíclicamente la temperatura desde 55 hasta -2,5 °C con agitación constante, usando ocho cubetas

(cuatro cubetas de muestra y cuatro celdas de referencia) en el módulo de muestreo. Los resultados muestran que el sistema UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier se puede utilizar para elaborar con rapidez un diagrama de solubilidad de ocho puntos para el efecto lechoso.

Experimento

Preparación de muestras

En total, se prepararon ocho diluciones de la muestra de pastís directamente en cubetas abiertas estándar de cuarzo de 10 mm provistas de una barra agitadora con forma de estrella y una tapa. Las concentraciones de alcohol en las muestras fueron del 45,0 (licor puro), 44,0, 42,5, 40,0, 37,5, 35,0, 32,5 y 30,0 % (v/v). Para garantizar la uniformidad, en cada cubeta se depositó un volumen total de 2,00 ml de solución.

Las celdas de referencia que contenían las diluciones correspondientes de etanol con agua desionizada (DI) se prepararon en cubetas de cuarzo con unas características ópticas similares, que también estaban provistas de una barra agitadora y una tapa. El uso de parejas de cubetas de cuarzo de características ópticas similares evitó tener que determinar el cero o la línea de base antes de iniciar las medidas. Todas las cubetas de muestra disponían de una sonda de temperatura, que se ajustó a una altura fija para que la punta estuviera completamente sumergida en la solución (Figura 4).

Instrumentos

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500, equipado con un módulo de muestreo Multicell Peltier, se controló mediante el software Agilent Cary UV Workstation.

Cada celda del módulo Multicell Peltier está emparejada con su propio detector; asimismo, cada cubeta puede equiparse con un agitador y una sonda de temperatura independiente. Así pues, en este estudio, las cuatro celdas de muestra estaban equipadas con una sonda de temperatura para monitorizar, medir y controlar la temperatura de cada zona (que comprendía una muestra y una referencia) en función de la lectura real de temperatura de la cubeta de muestra.

Barridos de longitud de onda para mezclas/componentes clave

Antes de realizar los experimentos con control de temperatura para las distintas concentraciones de alcohol, se obtuvieron los espectros UV-Vis del pastís puro, una solución de pastís diluida hasta el 45 % (v/v) de alcohol con etanol y una solución de pastís diluida hasta el 30 % (v/v) de alcohol; para ello, se usaron los ajustes indicados en la Tabla 1. En la celda de referencia se usó la solución correspondiente de etanol en agua DI.

Tabla 1. Parámetros del espectrómetro UV-Vis Agilent 3500 utilizados para la adquisición de los espectros UV-Vis de las muestras de pastís puro y diluido a 25 °C.

Parámetro	Ajuste
Intervalo de longitud de onda	De 200 a 1.100 nm
Intervalo de datos	1,00 nm
Tiempo promedio	0,02 s
Ancho de banda espectral	4,0 nm
Velocidad de agitación	800 rpm
Temperatura	25,0 °C

Investigación de la temperatura de solubilidad

Los parámetros de la rampa de temperatura utilizados para medir la temperatura de solubilidad de cada mezcla de pastís se resumen en la Tabla 2. Para todos los experimentos, se seleccionó una temperatura inicial de 25,0 °C. Se observó que algunas mezclas ya eran insolubles a temperatura ambiente. Por tanto, en la etapa 1 del programa de la rampa de temperatura se aumentó la temperatura de la cubeta a 55 °C para garantizar que todas las partículas en suspensión remanentes se disolvieran por completo. A continuación, en la etapa 2, se recogieron los datos reales desde 55 hasta –5 °C en el modo de absorbancia. Para todas las medidas, se usó la sonda de temperatura instalada en la celda de muestra de cada zona para el loop de retroalimentación del controlador de temperatura. En la siguiente sección se proporcionan más detalles sobre la selección de estos parámetros.

Tabla 2. Parámetros del espectrómetro UV-Vis Agilent 3500 para cada etapa del programa de temperatura.

	Etap 1 (calentamiento)	Etap 2 (enfriamiento)
Longitud de onda	750,0 nm	750,0 nm
Tiempo promedio	1,0 s	1,0 s
Ancho de banda espectral	4,0 nm	4,0 nm
Velocidad de agitación	400 rpm	400 rpm
Temperatura de inicio	25,0 °C	55,0 °C
Temperatura final	55,0 °C	–5,0 °C
Tiempo de permanencia	10,0 min	0 min
Intervalo de datos	1,0 °C	1,0 °C
Velocidad	5,0 °C/min	1,0 °C/min

El módulo de muestreo Cary 3500 Multicell Peltier está equipado con una línea de purga para evitar la condensación en las paredes externas de la cubeta durante la realización de experimentos a temperaturas inferiores al punto de rocío. Dado que el estudio del diagrama de solubilidad asociado al efecto lechoso exigía recoger medidas de la absorbancia por debajo de 0 °C, que es el punto de congelación del agua, se usó nitrógeno (N₂) como gas de purga con una velocidad de flujo de 10 l/min.

Resultados y comentarios

Identificación del intervalo de longitud de onda

El color ámbar característico del pastís puro con una concentración de alcohol del 45 % (v/v) se debe a los cromóforos asociados a la formulación del licor específico usado en este estudio. Por este motivo, se realizaron algunos barridos de control iniciales para determinar el intervalo de longitud de onda adecuado para las medidas de transición de fase.

El pastís puro (curva azul de la Figura 3) presenta una elevada absorbancia a longitudes de onda inferiores a 500 nm, hasta alcanzar el límite del intervalo fotométrico del sistema Cary 3500 equipado con un módulo Multicell Peltier; es decir, aproximadamente 4,5 unidades de absorbancia.

Para visualizar los cromóforos asociados al pastís, se preparó una solución diluida de pastís manteniendo constante la concentración de etanol para evitar la precipitación del anetol. La curva amarilla de la Figura 3 muestra dos picos diferenciados a 244 y 297 nm, así como una cola hasta los 460 nm, posiblemente debido al borde de un pico no resuelto. Es probable que esta cola se extienda hasta los 600 nm en el espectro del pastís puro (curva azul). A partir de estos valores, puede concluirse que no existe una cantidad significativa de cromóforos que contribuya a las medidas por encima de 600 nm. La curva verde de la Figura 3, correspondiente a una mezcla con un porcentaje de alcohol más bajo (30 %), es representativa de una solución turbia de pastís a temperatura ambiente.

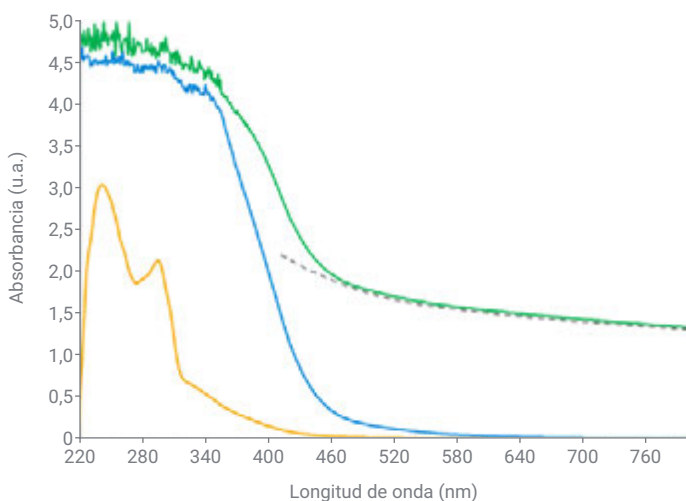


Figura 3. Espectro UV-Vis del pastís sin diluir (azul), el pastís diluido en una proporción 1:10 en etanol al 45 % (v/v) (amarillo) y una solución turbia de pastís con un 30 % de alcohol (v/v) (verde). La contribución de la dispersión de luz a la curva verde se indica mediante la línea gris discontinua.

Además del efecto de los cromóforos en el intervalo de 200 a 600 nm, puede observarse una contribución adicional por encima de 600 nm, tal como indica la línea gris discontinua de la Figura 3. Esta señal, que disminuye progresivamente y desplaza la señal a lo largo de todo el rango espectral, está asociada a la dispersión de luz causada por las partículas sin disolver que están en suspensión.

Se seleccionó una longitud de onda de 750,0 nm para determinar las temperaturas de las transiciones de fase. La señal de absorbancia aparente a 750,0 nm únicamente depende de la dispersión de luz, sin ningún tipo de contribución de los cromóforos.

Optimización de las condiciones de temperatura y las velocidades de enfriamiento

Las mezclas con menor porcentaje de alcohol de este estudio tienen temperaturas de transición próximas a la temperatura ambiente. En la Figura 4 se muestra una curva de solubilidad típica de una muestra con un bajo porcentaje de alcohol. A la temperatura inicial de 25,0 °C, la absorbancia aparente a 750 nm es significativa a causa de la dispersión de luz provocada por el anetol sin disolver que está en suspensión. El calentamiento inicial de la muestra hasta 55,0 °C (etapa 1 de la Tabla 2) reduce la absorbancia aparente hasta prácticamente cero, ya que todo el anetol precipitado se vuelve a disolver en la fracción de etanol de la solución de pastís. La velocidad de calentamiento es irrelevante en esta etapa, ya que el objetivo es disolver todas las partículas que puedan dispersar la luz. Las muestras se mantienen a la temperatura superior durante 10 minutos para permitir que finalicen los procesos de disolución lentos.

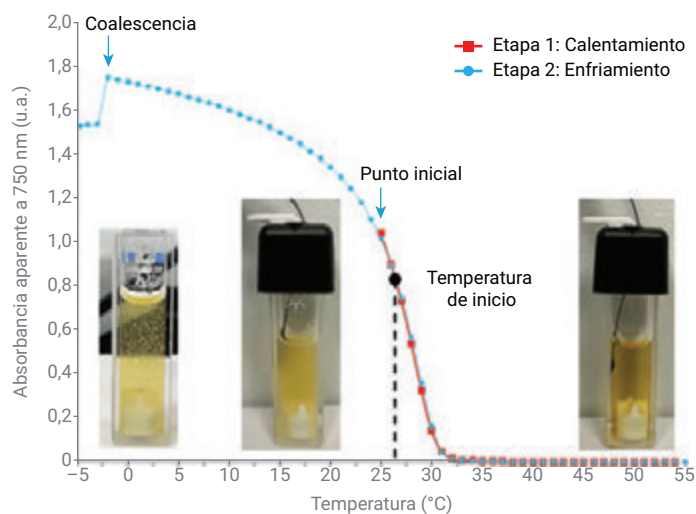


Figura 4. Curva típica asociada a una transición de fase de una muestra de pastís con un porcentaje de alcohol del 30 % (v/v). Durante la etapa 1 (■), las muestras se calentaron hasta 55 °C con agitación constante, produciendo una solución transparente, tal como se aprecia en la cubeta de la derecha. Durante la etapa 2 (●), la muestra se enfrió lentamente hasta -5 °C, produciendo una solución turbia, como se muestra en la cubeta de la parte central. Asimismo, se produjo una transición de fase adicional cerca del punto de congelación del agua, como se observa en la cubeta de la izquierda.

Durante la fase de enfriamiento (etapa 2 de la Tabla 2), la temperatura de cada zona se redujo lentamente hasta $-5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Las pruebas preliminares con una velocidad de enfriamiento más rápida ($>2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) revelaron que la transición de fase del anetol no alcanzaba el equilibrio, a pesar de la agitación eficiente de la solución. La cinética de la transición de fase se ralentizó en exceso al aumentar la velocidad de enfriamiento, produciendo una curva de histéresis de enfriamiento/calentamiento (no se muestran los resultados).

Se obtuvieron resultados reproducibles para una velocidad de enfriamiento igual o inferior a $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Cuando se cumplen las condiciones de temperatura, la absorbancia aparente aumenta sensiblemente antes de alcanzar una meseta. Este punto de inflexión se conoce como temperatura de inicio. La magnitud de la dispersión de luz aumenta a medida que precipita más anetol; asimismo, se produce una cierta precipitación de anetol en la fracción acuosa de las muestras de pastís, incluso en aquellas ligeramente diluidas.

Para algunas soluciones, se observó una caída repentina de la absorbancia por debajo de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta caída se muestra en la Figura 4. Algunas soluciones empezaron a desestabilizarse y presentar separación de fases por debajo de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que se confirmó mediante un examen visual de las cubetas, a pesar de la agitación continua e intensa de la solución. Este fenómeno ya se observó previamente y se explicó mediante la coalescencia (gotas de anetol que se combinan y forman gotas mayores), la floculación (gotas de anetol que se unen sin combinarse), la sedimentación (separación provocada por diferencias de densidad) y la maduración de Ostwald (aumento del tamaño de las gotas de anetol)². Cada uno de estos procesos hace que la absorbancia disminuya sensiblemente a medida que se produce el colapso de la nube uniforme de anetol precipitado. Se comprobó que esta transición de fase a baja temperatura es irreversible; es decir, no se observó una histéresis al recalentar la solución. A consecuencia de estas observaciones, se omitieron las temperaturas inferiores a $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el diagrama de solubilidad, ya que no afectaban al inicio de la precipitación.

Efectos del porcentaje (%) de alcohol en la temperatura de precipitación

Se repitieron los experimentos usando soluciones recién preparadas con diferentes porcentajes de alcohol (desde el licor puro hasta un $30,0\text{ } \%$ v/v). En la Figura 5 se presentan las curvas de enfriamiento de las diferentes muestras. Los resultados indican que incluso una adición mínima de agua al licor provoca un cambio en la temperatura de inicio a la que el anetol precipita. Existe una tendencia evidente de aumento de la temperatura de precipitación a medida que disminuye el porcentaje de etanol en la solución.

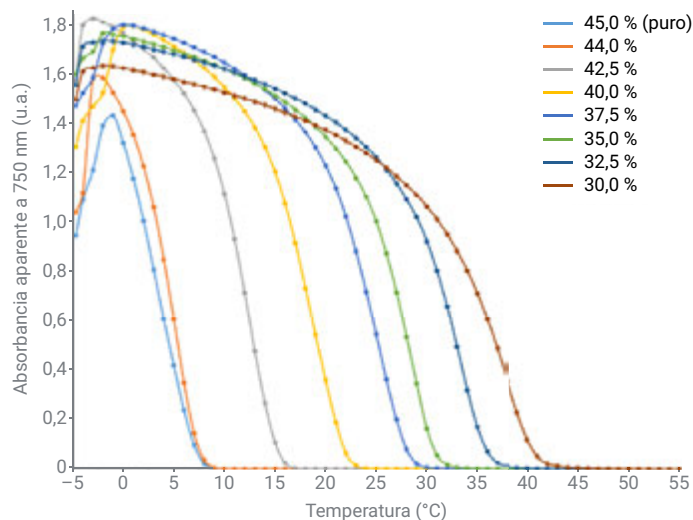


Figura 5. Curvas de enfriamiento durante la espectroscopia UV-Vis (etapa 2) de soluciones de pastís con una concentración de alcohol del 45,0, 44,0, 42,5, 40,0, 37,5, 35,0, 32,5, y 30,0 % (v/v).

Los experimentos se limitaron hasta el $30\text{ } \%$ (v/v) de alcohol, ya que las muestras con menores concentraciones de alcohol alcanzarán temperaturas cerca del punto de ebullición de la mezcla etanol/agua para solubilizarla inicialmente.

Determinación de las temperaturas de fase

Se aplicó el método de la primera derivada para determinar con exactitud la temperatura de fase para cada una de las curvas que aparecen en la Figura 5. Se usaron las temperaturas medias para elaborar el diagrama de solubilidad del anetol que se muestra en la Figura 6. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores de las tres réplicas.

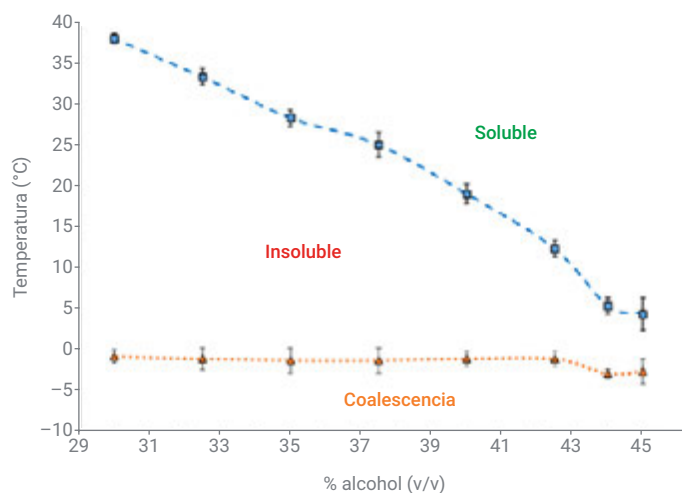


Figura 6. Diagrama de solubilidad del anetol de un pastís. Cada punto de datos corresponde al valor medio de temperatura, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de las tres réplicas.

Quizá la espectroscopia UV-Vis no sea la herramienta más evidente o adecuada para investigar la separación de fases que se produce cerca del punto de congelación del agua. Sin embargo, la temperatura a la que se produce también puede estimarse empleando el método de la primera derivada. Parece que esta transición de fase adicional es independiente de la concentración de alcohol de la solución, como muestra la línea naranja discontinua de la Figura 6. Dado que la transición se produce muy cerca de los 0 °C, podría especularse con la posibilidad de que esté asociada a los dominios del agua pura dentro de la emulsión.

Conclusión

Se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 equipado con un módulo de muestreo Agilent Multicell Peltier para elaborar un diagrama de fase de ocho puntos para el anetol de un pastís.

La función multizona del módulo Multicell Peltier con control de temperatura facilitó la realización de cuatro experimentos con rampas de temperatura en paralelo, con parejas de cubetas que contenían una muestra y una referencia. Esta capacidad permitió obtener un diagrama de solubilidad completo para el pastís mediante dos análisis de 73 minutos con el espectrómetro UV-Vis Cary 3500, un tiempo mucho menor que el necesario para elaborar un diagrama de fase empleando otras técnicas.

Para evitar la sedimentación durante las medidas, cada una de las ocho cubetas del sistema Multicell se equipó con un agitador independiente. La agitación continua también garantizó la uniformidad de la temperatura en todas las cubetas, lo que resulta un aspecto crítico en los experimentos con rampas de temperatura. La combinación del sistema Peltier refrigerado por aire y la purga con gas nitrógeno garantizaron que se alcanzaran valores programados de temperatura sensiblemente superiores a la temperatura ambiente e inferiores al punto de congelación del agua sin que se produjera condensación.

El estudio ha demostrado la idoneidad y la eficiencia del sistema UV-Vis Cary 3500, que ofrece un manejo sencillo, para elaborar diagramas de fase de muestras complejas y aportar información sobre el efecto lechoso.

Referencias

1. Farmacopea de Estados Unidos (2024). Capítulo general {855}. Nefelometría y turbidimetría. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de Estados Unidos. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M9373_03_01
2. Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed *trans*-Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, 21, 16, 7083–7089.

Más información

- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Compact
- Software Cary UV Workstation
- Preguntas frecuentes sobre la espectroscopia y los espectrofotómetros UV-Vis

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE-000868

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Impreso en EE. UU., 12 de septiembre de 2024
5994-7767ES