

Un método rápido para estudiar la influencia de la temperatura en las reacciones químicas

Reduzca el tiempo de experimentación realizando de modo simultáneo ensayos cinéticos a cuatro temperaturas



Autores

Kevin Grant y Matt Quinn
Agilent Technologies,
Australia

Introducción

Muchas aplicaciones químicas y de las ciencias de la vida requieren un conocimiento profundo de la dinámica de los procesos de reacción. Variables como la temperatura, el pH, la presión y la presencia de componentes químicos y macromoléculas adicionales pueden tener un efecto significativo en las velocidades de reacción. Comprender la influencia de tales parámetros resulta clave en una amplia variedad de aplicaciones, como la caracterización de enzimas, la síntesis química, la fabricación de alimentos y aquellos sectores que dependen de unas condiciones optimizadas de almacenamiento y estabilidad de los productos. Los espectrofotómetros UV-Vis se utilizan de forma rutinaria para ayudar a caracterizar y cuantificar la cinética de las reacciones, ya que pueden medir continuamente los cambios en la concentración a lo largo del tiempo, en función de la variación de la absorbancia con el tiempo.

El examen de los efectos de las diferentes temperaturas en la velocidad de la reacción es un proceso lento en el que los experimentos deben repetirse a diferentes temperaturas y requiere la instalación de equipos especializados en el compartimento de muestras del espectrofotómetro. Estos equipos suelen utilizar agua recirculada para mantener la temperatura de las muestras. Esto conlleva riesgos de inundación, ruido y aumenta la carga de mantenimiento del laboratorio.

Los recientes avances en la instrumentación espectrofotométrica basada en la temperatura ofrecen un importante ahorro de tiempo y un control de temperatura de mayor precisión. El espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multizone permite medir muestras a cuatro temperaturas diferentes en un solo experimento. El sistema Cary 3500 puede utilizar sondas de temperatura integradas en la cubeta para controlar con precisión la temperatura de las soluciones durante el experimento o puede funcionar por medio de la temperatura del bloque, que es muy adecuada para experimentos de temperatura estática. El soporte multicelda está integrado en el instrumento y utiliza Peltiers refrigerados por aire y sin agua para controlar la temperatura de las muestras entre 0 y 110 °C.

El objetivo de este estudio fue examinar la posibilidad de ahorrar tiempo al realizar medidas cinéticas de velocidad a cuatro temperaturas diferentes en un solo experimento. Para ello se utilizó la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (pNPA). Se trata de una reacción que se entiende bien y la velocidad de la reacción varía en función de la temperatura.

Experimento

En una solución alcalina, el acetato de p-nitrofenilo (pNPA) se somete fácilmente a hidrólisis para formar p-nitrofenol (PNP). El pNPA tiene un valor máximo de absorbancia a 270 nm y el PNP, a entre 405 y 410 nm, en función de la temperatura. Se realizaron barridos de la longitud de onda a lo largo del tiempo para monitorizar tanto el consumo de pNPA como la producción de PNP a medida que progresaba la reacción. El experimento se realizó a pH 7 y la velocidad de reacción de la muestra se determinó a 80 °C.

Muestras

Se preparó una solución 0,0001 M de p-NPA en metanol. También se preparó una disolución tampón fosfato (PBS) 100 mM de NaCl, 0,1 nM de EDTA y 10 mM de fosfato de sodio, que se ajustó a pH 7,0.

La solución salina tamponada con fosfato sin diluir se utilizó para establecer una línea base y también se utilizó como referencia durante cada medida. Para este experimento se utilizaron cubetas de cuarzo estándar de 3,5 ml y 10 mm de longitud del camino óptico con agitadores magnéticos tipo estrella que agitan a 500 rpm.

Instrumentación y método

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multizone para todas las medidas (Figura 1). Los parámetros del método se muestran en la Tabla 1.



Figura 1. El compartimento de la muestra del espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multizone dispone de un soporte multicelda integrado. Cada par muestra/referencia se puede mantener a una temperatura diferente.

Tabla 1. Los parámetros del instrumento.

Parámetro	Configuración
Rango de longitud de onda (nm)	220 – 520 nm (barrido)
Velocidad de barrido (nm/min)	1200
Ancho de banda espectral (nm)	5
Tiempo promedio de la señal (s)	0,1
Intervalo de datos (nm)	2
Velocidad de agitación (rpm)	500
N.º de zonas de temperatura	4
Temperatura (°C)	20, 40, 60, 80
Control de temperatura	Bloque

Cada cubeta de muestra se llenó con 2980 µl de disolución tampón fosfato y se colocó en el soporte multicelda (Figura 1). Se esperaron diez minutos para lograr el equilibrio de temperatura y después se agregaron 20 µl de p-NPA en solución de metanol.

Se recopilaron los barridos de absorbancia en todo el rango de longitud de onda de 220 a 520 nm cada 30 segundos durante 30 minutos. Estas medidas se realizaron de forma simultánea para cada ajuste de temperatura. Se utilizaron las funciones de análisis cinético integradas en el software Cary UV Workstation para generar una curva cinética y determinar la velocidad de reacción.

Resultados

La hidrólisis del pNPA conlleva la eliminación del grupo acetato en condiciones básicas. Cuando las condiciones están establecidas de tal manera que hay exceso de agua, la reacción puede considerarse como de pseudoprimer orden. Como el pH del tampón PBS se estableció en 7, se puede esperar una velocidad de reacción más lenta y predominará el comportamiento de segundo orden.

Efecto de la temperatura

En la Figura 2 se muestran los barridos de longitud de onda de la hidrólisis del pNPA a cuatro temperaturas diferentes. Existe una relación clara entre la temperatura de la muestra y la velocidad de reacción medida en función de la producción de PNP (Figura 2). A 80 °C, los puntos isostáticos son evidentes, lo que indica una conversión directa de pNPA en PNP. Los datos de la cinética de barrido de la longitud de onda para el experimento a 80 °C se utilizaron para producir un gráfico de absorbancia en función del tiempo, utilizando el pico de PNP a 408 nm (Figura 3). El cálculo de la velocidad de segundo orden (integrado en el software Cary UV Workstation) se utilizó para determinar la constante de la velocidad de segundo orden (k) de la reacción, establecida en $k = 883,194$ (1/[min.mol]).

Barridos de longitud de onda

Al realizar los barridos de longitud de onda en el tiempo, se puede detectar el consumo de pNPA y la producción de PNP (Figura 2). El rango de longitud de onda completo proporciona información adicional que de otro modo podría pasar desapercibida si se analizara una única longitud de onda. Por ejemplo, la posible presencia de intermedios de reacción, así como de cambios sutiles en la muestra, y la detección de puntos isostáticos, como se muestra en la Figura 2.

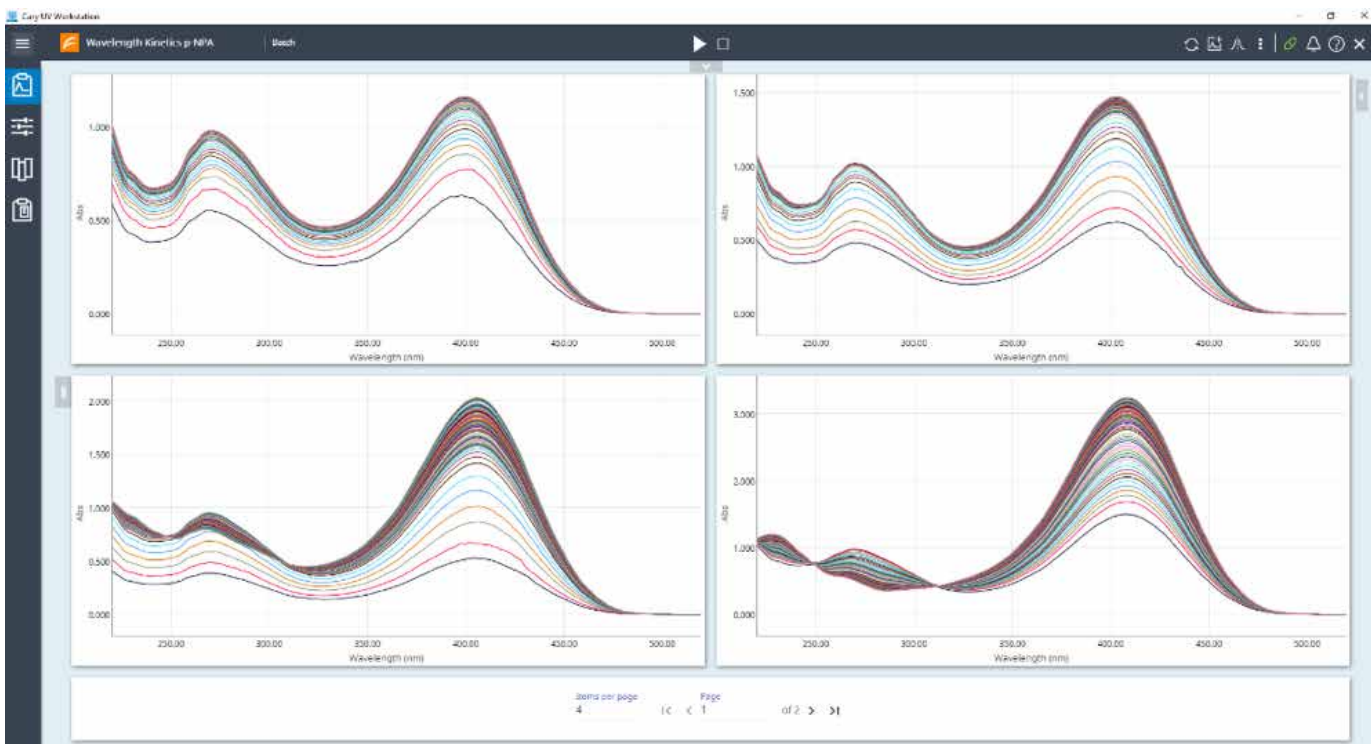


Figura 2. Barridos de longitud de onda a lo largo del tiempo en el rango de longitud de onda 220 - 520 nm, recogidos durante 30 minutos después de que se iniciara la reacción al mezclar los dos reactivos. Arriba a la izquierda a 20 °C, arriba a la derecha a 40 °C, abajo a la izquierda a 60 °C y abajo a la derecha a 80 °C.

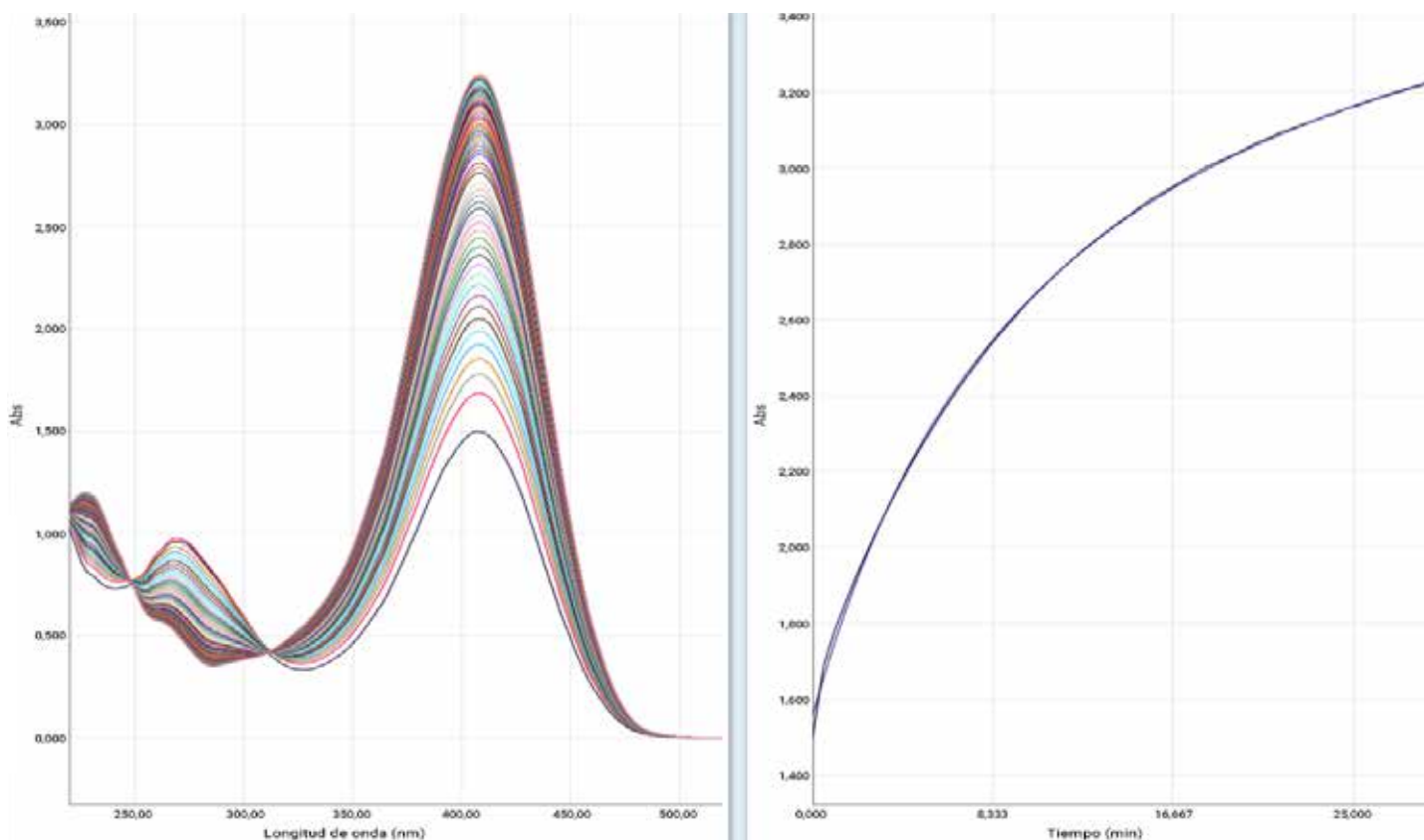


Figura 3. El espectro de la reacción se realiza a 80 °C con los puntos isobstéticos característicos (izquierda). El cambio en la absorbancia con el tiempo a 408 nm (derecha) se representó en el software Cary UV Workstation y se utilizó para determinar la velocidad de reacción.

Conclusiones

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multizone permitió monitorizar la hidrólisis del pNPA a cuatro temperaturas diferentes en un solo experimento. Los efectos de la temperatura sobre las velocidades de reacción se demostraron de forma simultánea a 20 °C, 40 °C, 60 °C y 80 °C, en un único experimento que duró 30 minutos.

La rápida recogida de espectros de longitud de onda durante el experimento también permitió que los datos se pudieran interpretar a diferentes longitudes de onda. Aunque se puede determinar la velocidad de reacción para las cuatro temperaturas, el mecanismo de reacción puede actuar de forma diferente. El análisis del intervalo de longitud de onda

completo para la reacción puede proporcionar información útil sobre el mecanismo de reacción.

Para una mejor comprensión de la cinética de reacción es fundamental conocer a fondo la interacción química y los procesos de reacción. Aunque proporcionan mucha información, la realización de experimentos detallados para investigar la dependencia de la temperatura de los procesos de reacción puede llevar mucho tiempo. Gracias a la funcionalidad única de múltiples temperaturas del sistema UV-Vis Agilent Cary 3500 Multizone, los datos cinéticos se pueden recopilar en un 25 % del tiempo que requerirían los sistemas UV-Vis tradicionales, lo que supone un ahorro de tiempo excepcional para el laboratorio.

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impreso en EE. UU., 30 de octubre de 2018
5994-0385ES