



MÉTODOS FÍSICOS GENERALES DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN I

Bioq. Cáceres Carolina

PROCESO DE MEDIDA QUÍMICA

Etapa pre-analítica ★

Etapa analítica ★

Etapa post analítica ★



ETAPA PRE-ANALÍTICA

- También llamada operaciones previas o etapa preparativa de muestra
- Incluye el acondicionamiento de la muestra y la separación de los analitos de sustancias interferentes.
- Es la etapa del análisis que lleva más tiempo, está más expuesto a errores y requiere de mayor trabajo en el laboratorio.



ETAPA ANALÍTICA

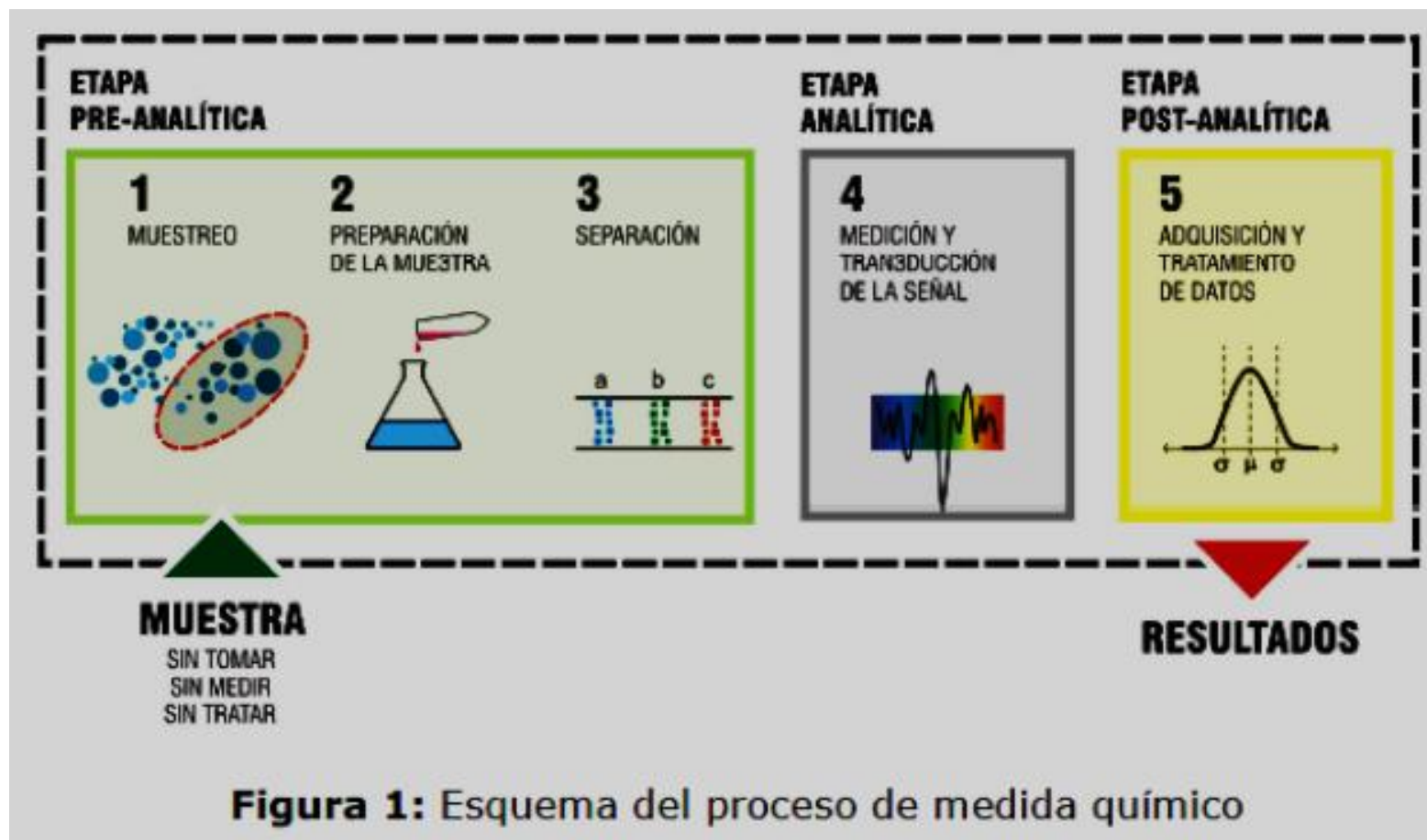
- Mediante instrumental analítico específico se intenta detectar, identificar y cuantificar el o los analitos de interés.



ETAPA POST - ANALÍTICA

- Donde se realiza la interpretación de los resultados y el tratamiento estadístico de los datos.





PRECONCENTRACIÓN DE ANALITOS

- Cada método de análisis tiene un intervalo de concentración óptima y para la optimización de la concentración se deberá tener en cuenta el límite de detección del ensayo y el intervalo de concentración de trabajo. Con estas consideraciones se logra la mayor precisión y la mayor exactitud en el ensayo.
- Incrementa la concentración de analitos antes del ensayo, este proceso puede llevarse a cabo mediante técnicas de extracción.



EXTRACCIÓN

- La extracción es el proceso por el cual un soluto pasa de una fase a otra.
- Objetivo: separar el analito desde la matriz o eliminar de la matriz a componentes que podrían actuar como interferentes en un análisis posterior (a este último objetivo, se lo suele denominar purificación de la muestra).



EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA

- La EFS es la técnica más usual en el pretratamiento muestras antes de su análisis por técnicas instrumentales como por ejemplo HPLC (Cromatografía Líquida de alto Rendimiento), GC (Cromatografía en fase Gaseosa), entre otras.



- La EFS se basa en la partición de los compuestos entre una fase líquida (muestra) y una fase sólida (extractante) gobernada por fuerzas intermoleculares entre ambas fases. Los compuestos a ser extraídos deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (fase líquida). La retención puede involucrar fuerzas polares, no-polares y de intercambio iónico.
- El analito retenido es posteriormente eluído con un pequeño volumen de solvente de elución proporcionando extractos altamente concentrados



La EFS puede utilizarse:

- a) Para retener al analito de interés, permitiendo que las interferencias (los componentes de la matriz distintos de los solutos de interés) pasen a través de la columna (**elevada constante de afinidad del analito con el adsorbente**).
- b) Para retener las interferencias, permitiendo que los compuestos de interés pasen a través de la columna disueltos en la fase acuosa de la muestra (**elevada constante de afinidad de las interferencias con el adsorbente**).



MECANISMOS

- Existen tres tipos de mecanismos para la extracción en fase sólida:
 - fase reversa ◆
 - fase normal ◆
 - intercambio iónico ◆
- La diferencia entre estos mecanismos radica en las distintas interacciones posibles entre los grupos funcionales de los analitos o solutos y los de la fase sólida.



FASE REVERSA

- Las retenciones en fase reversa implican matrices polares o moderadamente polares (usualmente fases líquidas como el agua) y una fase estacionaria no polar. Las Fases Estacionarias que más se utilizan son las de Carbono 8 (octilo) y Carbono 18 (octadecilo).
- Para romper las interacciones intermoleculares entre el soluto retenido en la superficie de la fase fija (proceso que se denomina ELUCION) se utiliza un solvente no polar o poco polar. En este tipo de mecanismo, el objeto es retener al analito de interés, por lo cual el pH de la muestra debe ajustarse para que los solutos no tengan carga neta, es decir estén en su forma neutra.



FASE NORMAL

- Las retenciones en fase normal implican analitos polares en matrices no polares o medianamente polares (acetona, solventes clorados y hexano) y fase estacionaria polar. Se utilizan grupos funcionales polares unidos a la sílicagel ($-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{Dioles}$). Un compuesto adsorbido por este mecanismo se eluye mediante un solvente más polar que la matriz original (donde estaban contenidos los solutos de interés



INTERCAMBIO IÓNICO

- Implica la transferencia de uno o más iones de la fase fluida al sólido por intercambio o desplazamiento de iones de la misma carga, que se encuentran unidos por fuerzas electrostáticas a grupos funcionales superficiales.



- La fase sólida, fase estacionaria o material adsorbente puede presentarse en diferentes configuraciones:
Compactadas en discos, Empacadas en cartuchos o Recubriendo una fibra (microextracción en fase sólida)



CARTUCHOS COMERCIALES

- El relleno es de silicagel con modificación química de la superficie expuesta o de distintos polímeros y se empaca dentro de cartuchos. La correcta elección del adsorbente se hará en función de la estructura y propiedades fisicoquímicas del analito que se desea extraer (en particular la polaridad y la presencia de determinados grupos funcionales) y de las características de los componentes de la muestra. Entendiendo la interacción intermolecular entre los interferentes presentes en la muestra, el analito de interés y el material adsorbente, se puede optimizar la separación



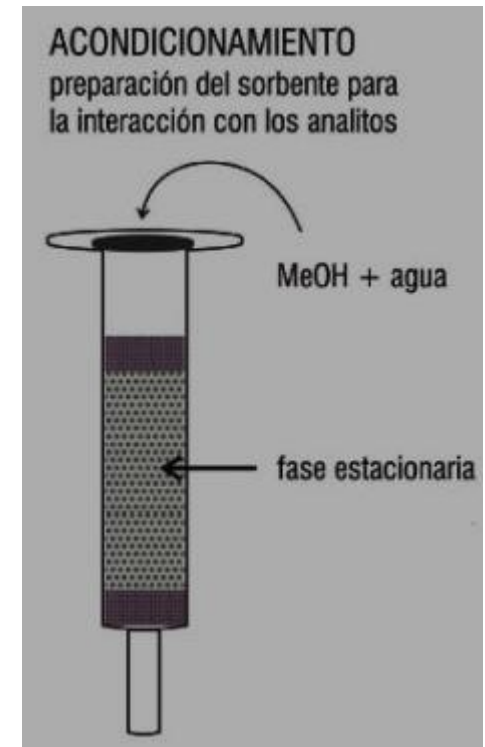
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Paso 1: Seleccionar una fase estacionaria apropiada. Comercialmente se dispone de tamaños variables de cartuchos, que difieren en la cantidad de relleno, influyendo en su capacidad para retener al analito.

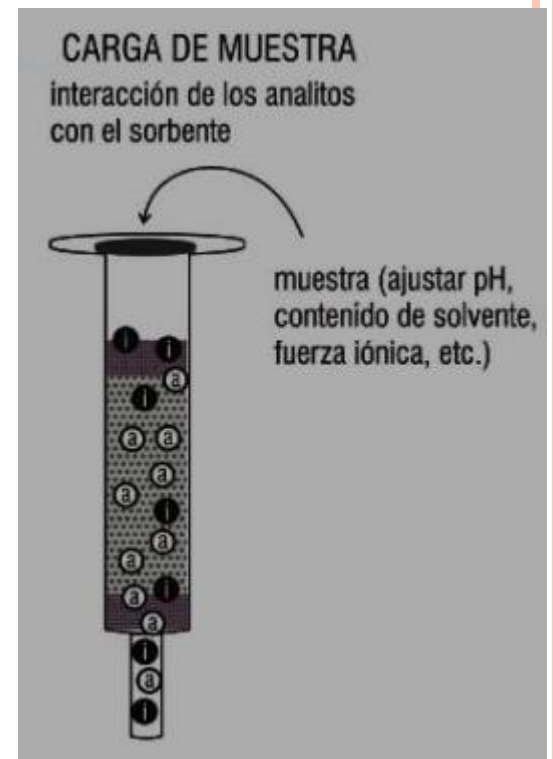
La capacidad está definida como la cantidad de analito que puede retenerse en el cartucho. La capacidad típica de retención de un adsorbente polar o no polar, es menor al 1 % de la masa del adsorbente y ocasionalmente puede alcanzar el 5 %.



- Paso 2: Acondicionar la Fase Estacionaria. Mediante solvatación se prepara al adsorbente para que la interacción con los analitos sea reproducible. La solvatación es el proceso de atracción y asociación de moléculas de un solvente con moléculas o iones de un soluto. Para extracción en fase reversa se acondiciona pasando un volumen apropiado de agua, seguido por un volumen de un solvente orgánico miscible en agua (por ejemplo, metanol). Por último, se adiciona una solución reguladora acuosa para ajuste del pH.



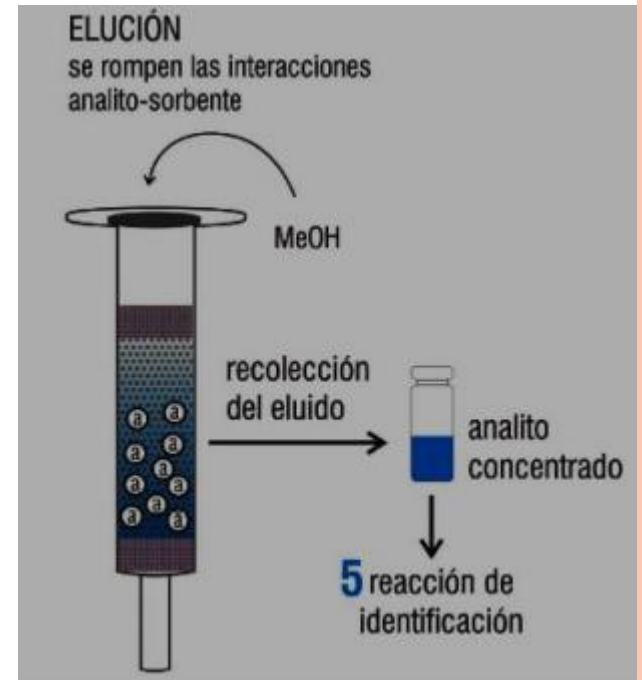
- Paso 3: Transferir la muestra al cartucho de extracción. La cantidad de muestra disponible puede estar comprendida en un rango muy extenso, desde pocos microlitros a varios litros, pero es una condición esencial que esté en una forma compatible con el sistema de EFS. Para favorecer la retención del analito en el adsorbente y para facilitar el flujo y distribución de la muestra en todo el relleno, es necesario que la muestra esté limpia, es decir, sin partículas ni materiales en suspensión y libre de todo tipo de material interferente. Por este motivo, para muestras complejas es necesario realizar un paso previo de acondicionamiento, que puede consistir en un proceso de desnaturalización previa de macromoléculas biológicas (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, etc.) La muestra debe pasarse, a través del cartucho, con una velocidad de flujo apropiada, de lo contrario se puede ver afectada la retención de ciertos compuestos.



- Paso 4: Lavar el empacado. Si el mecanismo de EFS implica la retención del compuesto de interés, el lavado deberá eliminar los compuestos no deseados o retenidos débilmente. Para ello, se debe utilizar el mismo solvente en el que está disuelta la muestra o alguna otra solución que no elimine el analito de interés.



- Paso 5: Eluir el compuesto de interés. Para la elución del analito retenido se utiliza una solución que rompa las interacciones entre el analito y el adsorbente. El eluido se colecta para su posterior análisis. Para que la elución sea más eficiente es conveniente utilizar dos alícuotas de volumen de solvente, en vez de una sola. La eficiencia es óptima con tiempos de contacto entre el solvente de elución y la fase estacionaria de 20 a 60 segundos



EXTRACCIÓN LÍQUIDO - LÍQUIDO

- Esta técnica se utiliza cuando la diferencia entre los puntos de ebullición de los compuestos de una mezcla es pequeña, pero existe una marcada diferencia en sus solubilidades relativas en distintos solventes orgánicos.
- La distribución diferencial o disolución selectiva o partición de un soluto o analito entre dos fases líquidas inmiscibles, es la base de los procesos extractivos.
- Esta distribución está regida por la Ley de NERNST



LEY DE NERNST

- A temperatura constante cualquier soluto se distribuirá entre dos solventes inmiscibles (sistema líquido bifásico) de forma tal que la relación de las concentraciones de equilibrio de la especie en una y otra fase es igual a una **CONSTANTE**, a esta constante la denominamos Constante de Distribución, Constante de Reparto o Coeficiente de Partición

$$Kd = \frac{\text{Conc. de analito en fase orgánica}}{\text{Conc. de analito en fase acuosa}}$$

Fase orgánica: solvente utilizado para la extracción

Fase acuosa: constituida por la solución muestra



- Hablamos de “Constante de Reparto” porque efectivamente uno o más solutos se reparten en cada fase del sistema de líquidos inmiscibles según las solubilidades relativas que tengan en cada uno de ellos, llegando a un equilibrio. Es decir, la partición si se mantienen las condiciones del sistema (temperatura, naturaleza de los solutos y naturaleza de los líquidos) se dará siempre de la misma forma por lo cual el cociente de las concentraciones en una y otra fase, llegado al equilibrio, tendrá un valor constante.
- La extracción líquido-líquido discontinua es una técnica ampliamente utilizada en las Sistemáticas Analíticas aplicadas a Tóxicos Orgánicos Fijos. Estas familias de especies tóxicas tienen puntos de ebullición relativamente altos por lo que no pueden ser aislados de sus matrices originales (muestras biológicas y no biológicas) por técnicas como la destilación simple, la microdifusión o head space, que si permiten la separación de principios volátiles, que presentan puntos de ebullición bajos y alta presión de vapor



OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO EXTRACTIVO LÍQUIDO-LÍQUIDO

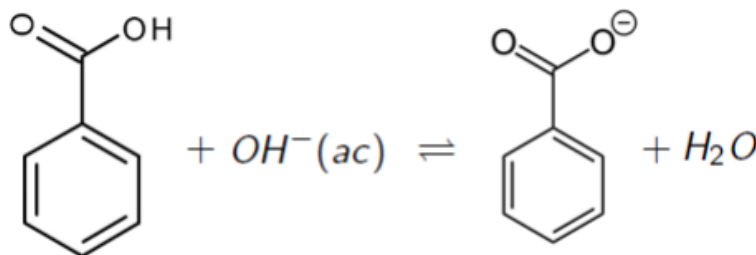
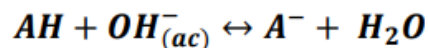
Deben considerarse ciertas variables:

- 1. Estructura Molecular Soluta - Solventes:
“lo semejante disuelve a lo semejante”

Un compuesto orgánico será soluble en otro si está químicamente emparentado con él, es decir, los dos principios deben pertenecer a la misma serie homóloga o a series con ciertas propiedades comunes.



- 2. Valor de pH de fase acuosa (muestra a extraer). El valor de pH debe ser acorde a los principios que se desean separar de la matriz original, teniendo como premisa que los solutos **con carga neta** son solubles en agua por interacciones electrostáticas con las moléculas de agua que tienen dos enlaces polarizados. Para que un soluto sea soluble en solventes orgánicos y pueda ser extraído de la fase acuosa debe estar en su forma neutra, no iónica. Esto implica que para separar compuestos de carácter ácido se acondicionará el valor de pH a 3 o 4, para asegurar que no se produzca la disociación de los grupos carboxilo, porque existe un exceso de protones en el medio acuoso. Para separar compuestos de carácter alcalino se acondicionará el valor de pH a 9, para asegurar que no se produzca la protonación de grupos amino de las bases a extraer (lo que significaría la adquisición de una carga neta positiva lo que hace inviable su disolución en solventes orgánicos), el pH 9 implica la presencia en el medio acuoso de un exceso de oxhidri]



- 3. Fuerza Iónica de fase acuosa: Se puede mejorar el rendimiento de los procesos extractivos si se adiciona a la muestra un electrolito fuerte (hidrosales) como, por ejemplo, cloruro de sodio. Los iones sodio y cloruro en solución interaccionan electrostáticamente con las moléculas polarizadas de agua y debilitan de esta forma los enlaces intermoleculares de los solutos con el agua que los mantenían en solución, esto facilita el paso de las sustancias de interés toxicológico al solvente de extracción.



- 4. Área superficial expuesta: Cuando se quiere extraer el principio activo presente en un comprimido de una especialidad farmacológica o un comprimido que contiene (presuntivamente) una droga de diseño, se pueden adoptar dos técnicas: una es someter a extracción con solvente orgánico directamente al comprimido, la otra técnica requiere la disolución previa del comprimido en agua, se ajusta el pH de esta disolución y se practica entonces una extracción líquido-líquido. Tanto en una como en la otra se requiere que el comprimido sea transformado en un fino polvo, previo a ser extractado. Esto se funda en que el área superficial que estará expuesta a la acción del solvente aumenta significativamente cuanto más pulverizado se encuentre el comprimido sólido original y en el caso de la previa disolución en agua, la reducción a polvo facilita la disolución



RENDIMIENTO DE UN PROCESO EXTRACTIVO

- El “Rendimiento” de un proceso extractivo puede elevarse si se practican sobre la misma muestra dos o más extracciones sucesivas. APUNTE
- Después de una primera extracción una fracción del soluto es retirada de la muestra acuosa original por el solvente orgánico utilizado como extractante. No obstante, como la fase acuosa aún contiene una cantidad remanente de soluto después de un primer ensayo extractivo, es recomendable repetir el proceso de extracción con nuevas cantidades de disolvente de extracción, para optimizar su separación.



- Si tengo un volumen “V” de solvente de extracción, tengo dos opciones:
- 1.- Practico un solo ensayo extractivo con la totalidad del volumen “V”
- 2.- Fraccio el volumen “V” en alícuotas de menor volumen y practico tantas extracciones sucesivas como fracciones de volumen tenga.
- Se demuestra que debe optarse por la alternativa “2” ya que es más eficiente practicar n extracciones con n fracciones de un volumen V/n de solvente de extracción que una única extracción con un volumen V de solvente.
- Si se practican extracciones sucesivas, se reúnen las fases orgánicas obtenidas en cada ensayo en un “extracto orgánico” único



- Del extracto orgánico se tiene que recuperar el o los solutos extraídos, para lo cual en una primera etapa se hace pasar ese solvente orgánico por un agente desecante con el fin de eliminar toda traza de humedad que pueda haber quedado contaminando el extracto orgánico luego de la operación de separación de la fase acuosa. Uno de los reactivos desecantes más utilizados en estas operatorias es el sulfato de sodio anhidro (exento de agua) que tiene alta capacidad para retener moléculas de agua.



- Terminado este proceso, es necesario eliminar el solvente orgánico del Extracto Orgánico para concentrar el o los solutos extractados, obteniendo lo que se denomina extracto seco. Esto se lleva a cabo por técnicas de destilación o evaporación.



MECÁNICA OPERATORIA

- El proceso extractivo se puede llevar a cabo en “Ampollas de Decantación”
- Este material de laboratorio tiene un diseño especial que permite, una vez finalizada la extracción, la separación de las fases inmiscibles involucradas



- La fase que se descarga depende de la densidad del solvente extractante, relativa a la densidad del agua. Si el solvente es más denso que el agua se ubicará en el fondo de la ampolla y cuando se abra la llave es el que se descargará, si el solvente es menos denso que el agua, se ubicará en la ampolla por encima de muestra acuosa y cuando se abra la llave de paso, es la fase acuosa la que se descarga.

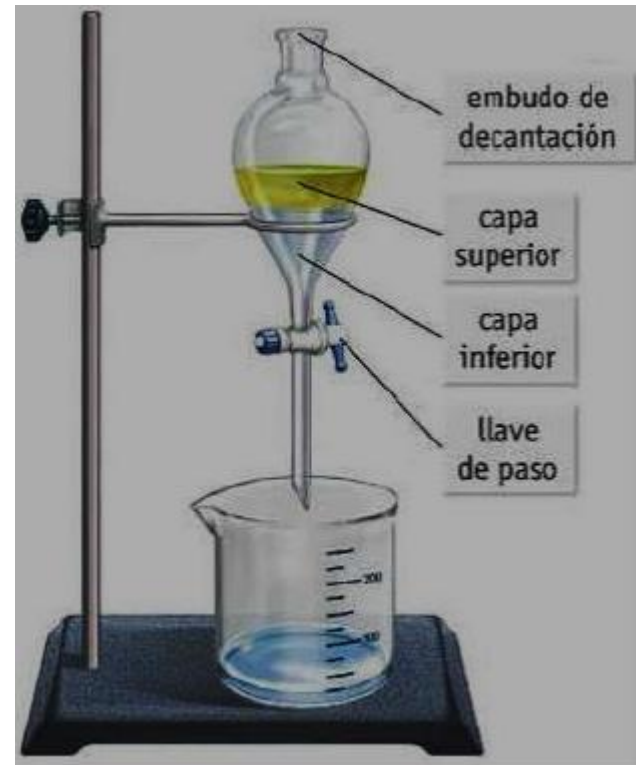


Tabla de disolventes de extracción comúnmente utilizados

Nombre	Fórmula	Densidad (g/mL) ¹	Punto de ebullición (°C)	Peligrosidad
Disolventes de extracción menos densos que el agua				
Éter dietílico	(CH ₃ CH ₂) ₂ O	0,7	35	Muy inflamable, tóxico
Hexano	C ₆ H ₁₄	≈ 0,7	> 60	Inflamable
Benceno	C ₆ H ₆	0,9	80	Inflamable, tóxico, carcinógeno
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	0,9	111	Inflamable

Acetato de etilo	CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	0,9	78	Inflamable, irritante
------------------	--	-----	----	-----------------------

Disolventes de extracción más densos que el agua				
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	1,3	41	Tóxico
Cloroformo	CHCl ₃	1,5	61	Tóxico
Tetracloruro de carbono	CCl ₄	1,6	77	Tóxico

¹ La densidad del agua es 1,0 g/mL, y la de la disolución acuosa saturada de NaCl es 1,2 g/mL.



CARACTERÍSTICAS DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN

- Que no sea miscible con el otro disolvente. El agua o una disolución acuosa suele ser uno de los disolventes implicados. El otro disolvente es un disolvente orgánico.
- Que el componente deseado sea mucho más soluble en el disolvente de extracción que en el disolvente original.
- Que el resto de componentes no sean solubles en el disolvente de extracción.
- Que sea suficientemente volátil, de manera que se pueda eliminar fácilmente del producto extraído mediante destilación o evaporación.
- Que no sea tóxico ni inflamable, no obstante, debe tenerse presente que hay pocos disolventes que cumplan los dos criterios: hay disolventes de baja toxicidad, pero inflamables como el hexano, otros no son inflamables pero tienen mayor riesgo tóxico como el diclorometano o el cloroformo, y otros son tóxicos e inflamables como el benceno.



- La cantidad de soluto que pase desde la muestra acuosa al solvente extractante será tanto mayor cuanto mayor sea el valor de la Constante de Distribución, es decir, cuanto mayor afinidad tenga el soluto por el solvente orgánico seleccionado como extractante, mayor será la fracción de soluto que abandone la muestra acuosa para disolverse en ese solvente orgánico.
- Después de unos 15 minutos de agitación suave, se deja la ampolla en reposo en su soporte y a los pocos minutos ambas fases vuelven a separarse nítidamente por mera decantación en función de sus diferentes densidades e inmiscibilidad.
- Cuando la interfase delimita claramente a ambas fases se procede a descargar (abriendo la llave de paso) la fase inferior (de mayor densidad). Si el solvente de extracción es menos denso que la muestra acuosa, una vez separadas las fases, quedará retenido en la ampolla porque al abrir la llave se descargó la fase acuosa. Por el contrario, si el solvente es más denso que el agua (por ejemplo diclorometano, cloroformo), al abrir la llave se descargará el solvente de extracción.



- Cualquiera sea el caso, el solvente de extracción, se hace pasar por sulfato de sodio anhidro contenido en un embudo de vidrio revestido internamente con papel de filtro, esta operación permite eliminar trazas de agua procedentes de la muestra acuosa extractada



- Finalmente, el extracto orgánico ya desecado, se concentra por simple evaporación para obtener un Extracto Concentrado (aún conserva parte del volumen del solvente extractivo a pesar de la evaporación) o un Extracto Seco, el cual es resultado de la completa evaporación del solvente orgánico. Los Extractos Concentrados se destinan directamente, a los ensayos analíticos de detección e identificación y, en su caso, de cuantificación. Los Extractos Secos deben ser previamente resuspendidos en un reducido volumen de solvente orgánico (determinados recursos analíticos requieren que el Extracto Seco se redisuelva en un solvente diferente del utilizado en la extracción por eso se requiere la evaporación total de este último)



DESTILACIÓN

- Es un método comúnmente utilizado para la purificación de líquidos y la separación de mezclas con el fin de obtener sus componentes individuales.
- Se basa fundamentalmente en los puntos de ebullición de cada uno de los componentes de la mezcla. Cuanto mayor sea la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias de la mezcla, más eficaz será la separación de sus componentes; es decir, los componentes se obtendrán con un mayor grado de pureza.



- La técnica consiste en calentar la mezcla hasta que ésta entra en ebullición. A medida que la mezcla se calienta, la temperatura aumenta hasta que alcanza la temperatura de la sustancia con punto de ebullición más bajo mientras que los otros componentes de la mezcla permanecen en su estado original. A continuación los vapores se dirigen hacia un condensador que los enfría y los pasa a estado líquido. El líquido destilado tendrá la misma composición que los vapores y; por lo tanto, habremos conseguido enriquecer el líquido destilado en el componente más volátil (el de menor punto de ebullición). Por consiguiente, la mezcla sin destilar se habrá enriquecido con el componente menos volátil (el de mayor punto de ebullición).



