



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



**FCEN** FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES  
Naturaleza - Ciencia - Humanismo

**“RECICLADO DE XILOL USADO EN  
PREPARACIONES PARA ESTUDIOS  
HISTOLÓGICOS. EMPLEO DE  
ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO CON  
TRANSFORMADA DE FOURIER Y ANÁLISIS  
MULTI-VARIABLE PARA EL SEGUIMIENTO  
DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN.”**

**Seminario de investigación y desarrollo presentado para obtener el título  
de Licenciada en Ciencias Básicas con Orientación Química.**

Alumna: Emilia del Carmen Abraham

Directora: Dra. Jorgelina Cecilia Altamirano

Codirector: Dr. José Alejandro D'Angelo

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Dios por mostrarme que las cosas suceden por un motivo, y que no siempre llegan cuando uno quiere, sino en el momento indicado.

Deseo agradecer profundamente a mi familia, mi sostén. A mi madre, gracias por ser mi fuente de inspiración, mi modelo a seguir, y apoyarme en todo lo que emprendo. Nada de lo logrado sería posible sin tu presencia en mi vida. A mi padre, gracias por alentarme siempre con tus palabras, y por mostrarme qué es lo que en verdad importa. A mi hermana, por ser mi confidente y mi compañera, por los encuentros después de los desencuentros, por las charlas sinceras, y por compartir conmigo cada día. A mis abuelas, Emilia que me cuida desde el cielo y me da fuerzas, y Carmen que, siempre incondicional, está pendiente de nosotros y vela por nuestro bienestar; gracias por todas sus enseñanzas de vida.

A Silvina, la gran persona que me acompaña día a día sin importar qué suceda. Gracias por la fuerza y el ánimo, el apoyo, la compañía y ayuda al enfrentar cada dificultad. En todo logro estas ahí, formando parte, ayudando a que se haga posible.

A mis primas y amigas, Fiore y Jess, Ar y Jul, dispuestas a hacer de cualquier momento, un instante de alegría y disfrute. Más allá de cualquier distancia, su eterno empuje siempre me levanta. A Antonio y Lili, constantemente pendientes, en cada uno de sus mensajes, de sus detalles.

A mis compañeras y amigas del ballet Tarab, Tam, Cami, Maqui y Mari. Nunca imaginé sentirme parte de algo tan importante. Un grupo de personas con las que se comparte una pasión, que siempre muestran su apoyo y se adaptan a los cambios, aceptándome tal cual soy.

A mis compañeros de carrera y de estudio. Mi amigo y consejero Mati, Flor, Joa, cada uno de ustedes, a su manera, ha formado parte de un pedacito de esta historia. Gracias a Giuli y a Agus, que, sin conocerme, me acompañaron en el estudio de las dos últimas materias. Sin ustedes, sin dudas hubiera sido mucho más difícil llegar hasta acá.

A mis amigas y alumnas del C.I.C. Juli, Cin, Vic, Carli, Emi y Sil, que siempre logran desconectarme, sacándome una sonrisa, transformando el trabajo en alegría.

A Vani, por ayudarme a ver en vez de mirar, y a disfrutar en lugar de dejar pasar.

Un profundo agradecimiento a mi directora, Jorgelina, sin la cual este gran sueño no sería posible. Por creer en mí, por su confianza, aliento, profesionalismo y calidez, y por permitirme formar parte del LQA, en un equipo de grandes profesionales, único por su calidad humana. Gustavo, quien fue un gran mentor durante los primeros pasos, Sabri, Juan, Belén y Esteban, gracias por toda su ayuda y por responder a cada inquietud, siempre con la mejor predisposición. Gracias a mi codirector José por todas las enseñanzas, por la paciencia y por ayudarme a ver más allá. Jorgelina y José, es un placer y un orgullo para mí, continuar junto a ustedes en esta nueva etapa que comienza.

Finalmente, gracias a cada una de las personas e instituciones que hicieron posible llegar a esta meta. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a la Universidad Nacional de Cuyo, y al Laboratorio de Química Ambiental del IANIGLA, CCT CONICET-Mendoza, por ofrecer el espacio para poder desarrollarme como profesional y como persona.

## **RESUMEN**

El xilol es un solvente orgánico aromático tóxico e inflamable, regulado por SEDRONAR, que presenta numerosas aplicaciones industriales y analíticas. Entre ellas, se encuentra su empleo como agente deshidratante, y extractante de medios de inclusión para tejidos, en la realización de preparados de histología.

El uso rutinario de xilenos en estudios histológicos acarrea consigo la problemática de la disposición final de los desechos generados a partir de su uso. El solvente en cuestión no debe ser descartado por la red cloacal, debe manipularse bajo estrictos controles de uso, y el costo de tratamiento del residuo disponible en el mercado, es muy elevado. Como consecuencia, muchas entidades optan por el almacenamiento indefinido, hasta dar con una solución viable.

Ante esta situación, el Laboratorio de Química Ambiental del IANIGLA toma la iniciativa de poner a punto un tratamiento de purificación de xilol, para lo cual, se realizaron pruebas piloto satisfactorias. Para aseguramiento del proceso de purificación, y evaluación de la calidad del xilol resultante, se requería contar con un seguimiento analítico instrumental y análisis estadístico, lo cual fue el objeto de estudio del presente seminario de investigación. En este sentido, se evaluaron comparativamente dos posibles métodos de purificación de xilol, los cuales se basaron en la técnica de centrifugación y la destilación fraccionada, respectivamente. El seguimiento a lo largo del proceso de purificación se llevó a cabo mediante análisis por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). El estudio y la validación de los datos obtenidos, se basó en el análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA), y análisis de la varianza (ANOVA). El PCA fue utilizado como herramienta estadística para la evaluación integral de los resultados. El ANOVA permitió determinar si los resultados obtenidos mediante las metodologías aplicadas mostraban diferencias significativas, y seleccionar aquella con la cual se pudiera lograr una mejor purificación del xilol.

## **TABLA DE ABREVIATURAS**

En la siguiente tabla se presentan en orden alfabético, las abreviaturas empleadas a lo largo del manuscrito y sus significados.

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ANOVA	Análisis de la varianza.
BTX	Benceno, tolueno y xileno.
C	Muestras de centrifugación.
CD (A o B)	Cola de destilación, correspondientes a destilaciones A y B.
FD (A o B)	Fracciones de destilación, correspondientes a las destilaciones A o B.
FT-IR	Espectrometría de Infrarrojo con transformada de Fourier
MFD (A o B)	Mezcla de fracciones de destilación, correspondientes a las destilaciones A o B.
MIT	Medio de inclusión para tejidos.
MPH	Muestra de partida de histología
PCA	Análisis de componente principales
S/R	Relación señal ruido.
XC	Xileno comercial.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	III
TABLA DE ABREVIATURAS.....	IV
CAPÍTULO I.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. XILOL.....	2
1.1.1. Propiedades físico-químicas del xilol.....	2
1.1.2. Métodos de obtención del xilol.....	4
1.1.2.1. Coquización de hulla.....	5
1.1.2.2. Reformado de bencina.....	5
1.1.2.3. Extracción líquido-líquido.....	5
1.1.2.4. Separación de isómeros del xileno.....	6
1.1.3. Riesgos de exposición y toxicidad.....	7
1.1.4. Manipulación en el laboratorio.....	7
1.1.5. Usos.....	8
1.1.6.    Uso de xilol en histología.....	8
1.1.6.1. Técnica de preparación de cortes histológicos.....	8
1.1.6.2. Xilol como desecho de preparados histológicos.....	10
1.1.6.3. Purificación de xilenos de preparados histológicos.....	11
1.2. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO.....	12
1.2.1. Fundamentos.....	12
1.2.2. Zonas de absorción en infrarrojo.....	13
1.2.3. Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier.....	15
1.2.4. Preparación de muestras.....	15
1.2.4.1. Muestras sólidas.....	15
1.2.4.2. Muestras líquidas y soluciones.....	16
1.2.5. Aplicaciones de la espectrometría de infrarrojo.....	18
1.2.5.1. Zonas características de espectros FT-IR de xilenos.....	18
1.2.6. Tratamiento de Espectros.....	21

1.2.6.1. Corrección de línea de base .....	21
1.2.6.2. Deconvolución .....	21
1.3. QUIMIOMETRÍA.....	23
1.3.1. Definición y aplicaciones .....	23
1.3.2. Análisis estadístico multivariado.....	23
1.3.3. Parámetros estadísticos.....	24
1.3.4. Análisis de componentes principales (PCA) .....	25
1.3.4.1. Análisis de resultados mediante PCA.....	26
1.3.5. Análisis de la varianza (ANOVA).....	28
CAPÍTULO II.....	31
2. EXPERIMENTAL.....	31
2.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	31
2.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA, SOFTWARE Y EQUIPOS MENORES .31	
2.2.1. Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	31
2.2.2. Prensa hidráulica.....	32
2.2.3. Pastillero .....	32
2.2.4. Equipo de destilación .....	33
2.2.5. Centrífuga .....	33
2.2.6. Mufla .....	34
2.2.7. Micropipeta.....	34
2.2.8. Balanza .....	34
2.2.9. Vórtex .....	35
2.2.10. Material del vidrio y mortero de ágata .....	35
2.2.11. Software.....	35
2.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO .....	36
2.3.1. Muestras de referencia.....	36
2.3.2. Decantación .....	36
2.3.3. Centrifugación .....	37
2.3.4. Destilación fraccionada .....	37
2.3.5. Pastillas de bromuro de potasio.....	39
2.3.6. Adquisición de espectros FT-IR.....	39
2.3.7. Tratamiento de espectros FT-IR.....	39

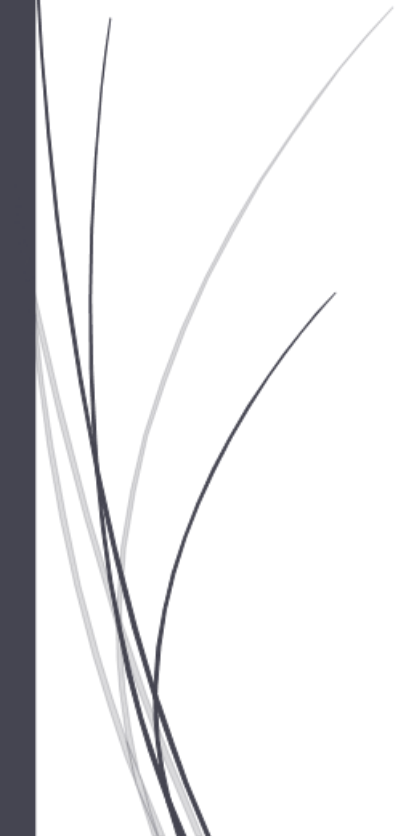
2.3.7.1. Corrección de línea de base .....	39
2.3.7.2. Autodeconvolución de Fourier .....	40
2.3.7.3. Análisis semicuantitativo: cocientes de áreas .....	40
2.3.8. Análisis de componentes principales (PCA) .....	42
2.3.9. Análisis de la varianza (ANOVA).....	42
CAPÍTULO III .....	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
3.1. ENSAYOS PRELIMINARES .....	44
3.1.1. Selección del tiempo de centrifugación.....	44
3.1.2. Condiciones de destilación .....	45
3.1.3. Optimización de condiciones de preparación de pastillas .....	46
3.1.4. Eliminación de valores atípicos y de variables no informativas por PCA .....	48
3.1.4.1 Valores atípicos.....	48
3.1.4.2. Variables no informativas .....	51
3.2 RESULTADOS.....	52
3.2.1. Xilol comercial (XC) vs. muestra de partida de histología (MPH).....	57
3.2.2. Centrifugación .....	58
3.2.2.1. Presencia de NaCl.....	59
3.2.2.2 Velocidad de centrifugación .....	59
3.2.3. Destilación.....	60
3.2.3.1. Colas de destilación .....	61
3.2.3.2. Fracciones de destilación .....	62
3.2.3.3. Mezcla de fracciones de destilación .....	64
CAPÍTULO IV .....	66
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	66
4.1. Conclusiones .....	66
4.2. Perspectivas futuras.....	67
CAPÍTULO V .....	69
5. BIBLIOGRAFÍA .....	69





# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN



# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. XILOL

El xilol, también denominado como xilenos, es un solvente aromático volátil que comercialmente se encuentra como una mezcla de tres isómeros: orto-xileno (1,2-dimetilbenceno), meta-xileno (1,3-dimetilbenceno) y para-xileno (1,4-dimetilbenceno). El meta-xileno se encuentra en mayor proporción (entre 60% y 70%) y el para-xileno en menor proporción (< 5%)<sup>1</sup>. Mediante análisis por cromatografía de gases, se ha encontrado que además puede contener etilbenceno, como impureza del proceso de obtención<sup>2</sup>.

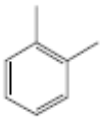
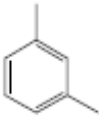

#### 1.1.1. Propiedades físico-químicas del xilol

Los datos físico-químicos de los isómeros que presenta el xileno se resumen en la Tabla 1.1<sup>1,3,4</sup>. En dicha tabla se pueden observar las siguientes características:

- Los isómeros son moléculas con la misma fórmula molecular, pero diferente estructura. Por este motivo, los isómeros orto-, meta- y para-xileno poseen el mismo peso molecular. Los tres xilenos, presentan isomería constitucional o estructural de posición<sup>5</sup>.
- Las densidades de las moléculas descritas varían desde 0,861 g/mL en el caso del isómero para-xileno, hasta 0,880 g/mL para el isómero orto-xileno. El isómero meta-xileno presenta una densidad intermedia más cercana a la del para-xileno, con un valor de 0,868 g/mL. El xilol por ende, resulta menos denso que el agua, cuya densidad es 0,997 g/mL a 25°C y 101,3 kPa<sup>6</sup>.
- Los puntos de ebullición de los isómeros meta- y para-xileno son muy cercanos entre sí, 139,3°C y 138,3 °C, respectivamente. El orto-xileno presenta el punto de ebullición más elevado a 144,0 °C.
- El punto de fusión, difiere notablemente entre los tres isómeros. El meta-xileno presenta el menor punto de fusión a -47,8 °C, luego orto-xileno funde a -25 °C. El isómero con mayor temperatura de fusión, es el para-xileno; éste se destaca de los otros dos por situarse por encima de 0 °C.

- La solubilidad en agua de los tres isómeros es prácticamente nula. El xileno resulta inmisible en agua.

**Tabla 1.1.** Principales características y propiedades físico-químicas de xilenos.

Isómero	orto-xileno	meta-xileno	para-xileno
<b>Nomenclatura IUPAC*</b>	1,2-dimetilbenceno	1,3-dimetilbenceno	1,4-dimetilbenceno
<b>Número CAS**</b>	95-47-6	108-38-3	106-42-3
<b>Estructura química</b>			
<b>PM [g/mol]</b>	106,2	106,2	106,2
<b>Descripción física</b>	Líquido incoloro con olor aromático	Líquido transparente e incoloro con olor aromático	Placas o prismas incoloros a bajas temperaturas; líquido incoloro con olor aromático
<b>Densidad [g/mL] a 25 °C y 101,3 kPa</b>	0,880	0,868	0,861
<b>Punto de ebullición a 101,3 kPa [°C]</b>	144,0	139,3	138,3
<b>Punto de fusión a 101,3 kPa [°C]</b>	-25,0	-47,8	13,0
<b>Presión de vapor a 25 °C [kPa]</b>	0,88	1,10	1,20
<b>Solubilidad en agua a 25 °C y 101,3 kPa (% V/V)</b>	0,02	0,02	0,02
<b>Punto de ignición a 101,3 kPa [°C]</b>	32 v.c.	27 v.c.	27 v.c.
<b>Punto de autoignición a 101,3 kPa [°C]</b>	463	527	528

\*IUPAC: Unión internacional de química pura y aplicada. \*\*CAS: Identificación numérica única de compuestos químicos, establecida por chemical abstracts service. v.c.: parámetro determinado a vaso cerrado.

El punto de inflamación es la temperatura mínima, a presión de una atmósfera (101,3 kPa), a la que una sustancia combustible, en contacto con el aire, desprende la cantidad suficiente de vapor para que se produzca la inflamación de la mezcla vapor-aire

mediante el aporte a la misma de una energía de activación externa. Dicha energía puede ser de origen térmico (llama), mecánico (fricción), eléctrico (chispa) o químico (reacción exotérmica). Al valor se suele añadir "v.a", vaso abierto o "v.c", vaso cerrado, para indicar el método de determinación del parámetro. Este parámetro también suele denominarse como "punto de ignición"<sup>7</sup>.

El punto de autoignición es la temperatura mínima, a presión de una atmósfera (101,3 kPa), a la que una sustancia, en contacto con el aire (más bien con el oxígeno), arde espontáneamente sin necesidad de ningún aporte energético adicional a la mezcla. Se diferencia de la temperatura de inflamación, en que no necesita foco de ignición para generarse la combustión. También en este caso, una cantidad de oxígeno en aire superior a la normal, o el efecto catalítico de metales u otros contaminantes puede provocar un descenso de la temperatura de autoignición<sup>7</sup>.

### **1.1.2. Métodos de obtención del xilol**

Los compuestos aromáticos derivados del benceno, son de importancia industrial y económica. Son la principal materia prima de compuestos químicos de uso global como por ejemplo plásticos, productos de caucho y de fibra sintética.

Las potenciales vías de obtención de compuestos aromáticos son: síntesis a partir de moléculas pequeñas, aislamiento directo del carbón o de petróleos parafínicos-aromáticos y, preferentemente, la obtención mediante procesos pirolíticos o catalíticos a partir de carbón o petróleo con posterior aislamiento.

Respecto a la obtención de compuestos aromáticos a partir de moléculas pequeñas, en 1868, M. Berthelot logró por primera vez sintetizar benceno partiendo de tres moles de etino o acetileno<sup>8</sup>. El método consiste en hacer pasar acetileno a través de un tubo de porcelana calentado al rojo.

Por otra parte, las fuentes de materias primas de compuestos aromáticos son: productos de la destilación seca de hulla (coquización), reformado de bencina (mezcla líquida de alcanos como pentano, hexano y heptano) a partir de bencina bruta, y bencina de pirolisis de la disociación de nafta con vapor<sup>9,10</sup>. A continuación, se hará una breve

descripción de los distintos métodos de obtención de compuestos aromáticos, a partir de las materias primas previamente mencionadas.

#### ***1.1.2.1. Coquización de hulla***

La hulla (carbón mineral) contiene hidrocarburos aromáticos como combinaciones de moléculas de alto peso molecular. Mediante el proceso de coquización, es decir, transformación de la hulla y los residuos pesados del petróleo en coque (combustible sólido), se disocian y transponen. Para llevar a cabo este proceso, es necesaria la aplicación de elevadas temperaturas (1000 a 1400°C).

Las moléculas aromáticas más pequeñas que se forman en los tres productos de la coquización (gas bruto, agua de coquería y alquitrán), pueden aislarse por métodos especiales. Del gas de coquería o gas bruto, se separan los compuestos aromáticos, por lavado de los gases con hidrocarburos de ebullición alta (aceite de antraceno), o por adsorción sobre carbón activado. La mezcla de compuestos aromáticos se destila posteriormente del aceite de lavado, o se desorbe del carbón con vapor de agua. La destilación, da como producto el denominado benceno bruto (BTX), formado mayoritariamente por benceno, tolueno, y en un 6% de su volumen por xilenos. Minoritariamente posee etilbenceno, entre otros compuestos aromáticos superiores<sup>9</sup>.

#### ***1.1.2.2. Reformado de bencina***

El reformado de la bencina o éter de petróleo, es una forma particular de craqueo catalítico (descomposición térmica). Se producen un conjunto de isomerizaciones, ciclaciones y deshidrogenaciones (aromatizaciones) en presencia de catalizadores como, por ejemplo, platino.

La elaboración por destilación del producto bruto reformado permite separar una fracción rica en compuestos aromáticos. Debido a su elevado punto de ebullición, son una fuente importante para la obtención de tolueno e isómeros del xileno<sup>9</sup>.

#### ***1.1.2.3. Extracción líquido-líquido***

La recuperación de compuestos aromáticos puros a partir de mezclas de hidrocarburos no es posible utilizando el proceso de destilación. Esto se debe a que los

puntos de ebullición de algunos compuestos alifáticos son muy cercanos a los aromáticos que se desean recuperar. Además, pueden formarse azeótropos entre compuestos alifáticos y aromáticos, generando que la mezcla de ambos posea el mismo punto de ebullición.

Las extracciones líquido-líquido han resultado de amplia aplicación en la industria. Los procesos más utilizados, desarrollados y patentados por industrias petroleras, son Udex, Sulfolan y Arosolvan. En la Tabla 1.2 se puede observar que los tres métodos emplean solventes, o mezclas de ellos, y condiciones de temperatura y presión específicas. Las extracciones líquido-líquido se realizan en columnas de extracción bajo el principio de contracorriente<sup>9,11</sup>.

**Tabla 1.2.** Extracciones líquido-líquido para la obtención de compuestos aromáticos.

Proceso	Propiedad de empresa	Solvente	Condiciones de extracción
Udex	UOP-Dow	Mono-, di-, tri- o tetraetilenglicol/H <sub>2</sub> O y mezclas	130-150 °C, 500-700 kPa
Sulfolan	Shell-UOP	Dióxido de tetrahidrotiofeno (sulfolan)	50 °C
Arosolván	Lurgi	N-metilpirrolidona/H <sub>2</sub> O	20-40 °C, 100 kPa

#### 1.1.2.4. Separación de isómeros del xileno

Para llevar a cabo la separación de los isómeros del xileno, en primer lugar, se realiza una destilación fraccionada de la mezcla, para separar el orto-xileno del meta-xileno y el para-xileno. El punto de ebullición del isómero orto- es aproximadamente 5 °C mayor que el de los otros dos. Luego, en la cabeza de destilación se obtiene una mezcla de etilbenceno, meta- y para-xileno, que después de una laboriosa destilación se logra liberar del etilbenceno (componente más volátil). El resultado es una mezcla en la proporción aproximada 2:1 meta-xileno:para-xileno. Posteriormente, se seca cuidadosamente sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o SiO<sub>2</sub>.

Finalmente, se lleva a cabo un enfriamiento progresivo para separar cristales de para-xileno del meta-xileno líquido, cuyos puntos de fusión son 13 °C y -47,8 °C,

respectivamente. Es importante destacar que para evitar taponamientos por formación de hielo, el contenido de agua debe disminuir a aproximadamente 10 µg/mL en la etapa de secado<sup>9,12</sup>.

### **1.1.3. Riesgos de exposición y toxicidad**

La intoxicación aguda produce síntomas como fatiga, mareo, temblores, disnea, en algunas ocasiones náuseas y vómitos. También puede observarse irritación cutánea, de las mucosas oculares, de los riñones y de las vías respiratorias altas. En casos más severos, puede ocasionar hasta la pérdida del conocimiento<sup>1</sup>.

La exposición crónica causa debilidad general, insomnio, excesiva fatiga, cefalea, mareo, irritabilidad, pérdida de memoria y zumbidos en los oídos. Además, en algunos casos, se detectan vestigios de xileno en los órganos, en especial, en las glándulas suprarrenales, la médula ósea, el bazo y el tejido nervioso. Por otra parte, se puede percibir sabor dulce en la boca, pérdida del apetito, sed, sensación de quemazón en los ojos y hemorragia nasal.

Las alteraciones más comunes son a nivel cardiovascular, pero también se han observado trastornos funcionales en el sistema nervioso central, en la síntesis de proteínas y deterioro en la actividad inmunológica. Las mujeres pueden sufrir alteraciones en el ciclo menstrual y se ha visto que las trabajadoras expuestas a xilenos en concentraciones que sobrepasaban periódicamente los límites de exposición, también se ven afectadas por problemas durante sus embarazos (toxicosis, amenaza de aborto, hemorragias durante el parto) y esterilidad<sup>1</sup>.

### **1.1.4. Manipulación en el laboratorio**

Deben mantenerse ciertos recaudos durante la manipulación del xilol en el laboratorio. Además de los riesgos para la salud especificados en la sección precedente, existen riesgos físicos y químicos que deben tenerse en cuenta. Pueden generarse cargas electrostáticas como resultado del flujo o la agitación. Y reacciona violentamente con oxidantes fuertes como el ácido nítrico, ocasionando peligro de incendio y explosión<sup>1</sup>.

### 1.1.5. Usos

Los xilenos se emplean como diluyentes de barnices y pinturas, como aditivos de alto octanaje en combustibles para aviones, en productos farmacéuticos y en la producción de colorantes y ácidos ftálicos, entre otros. El xilol también se utiliza para preparar muestras para cortes histológicos, debido a que disuelve bálsamo de Canadá (medio de montaje), poliestireno, parafinas, y otros medios de inclusión para tejidos (MIT), como por ejemplo Histoplast® o Paraplast®<sup>1</sup>.

### 1.1.6. Uso de xilol en histología

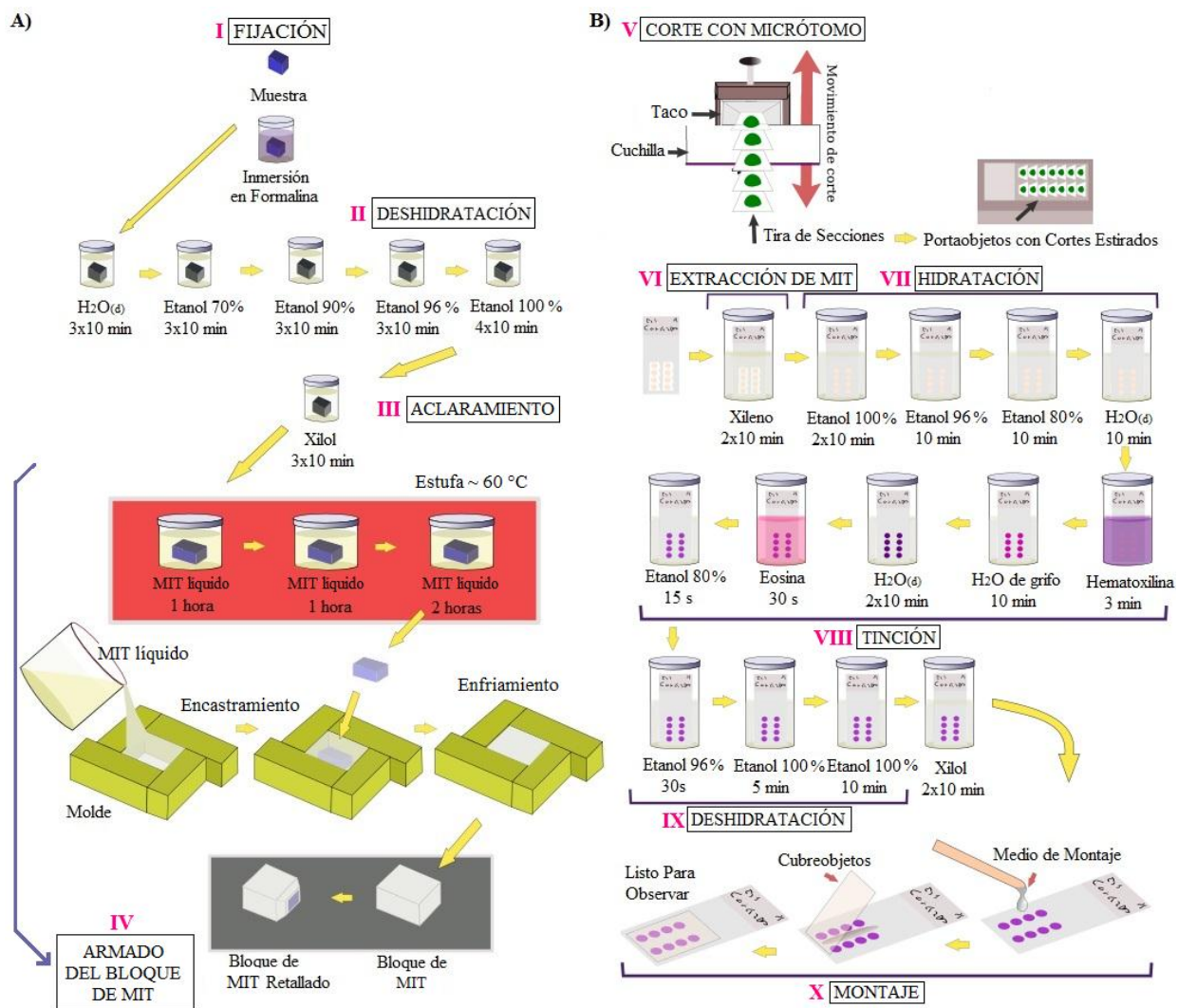
#### 1.1.6.1. Técnica de preparación de cortes histológicos

La técnica de preparación de muestras más utilizada en estudios histológicos, involucra los pasos que se detallan en el ejemplo de la Figura 1.1. Cabe destacar que el número de repeticiones, y el tiempo de permanencia de la muestra en cada una de las etapas, pueden variar. Ambos dependen de las características de la muestra, y de las condiciones operativas que establezca el manipulador para lograr mejores preparados. A continuación se dará una breve explicación a cada una de las etapas de la metodología de preparación de muestras para estudios histológicos<sup>13</sup>:

- I. **Fijación:** El tejido se fija en formol (solución acuosa de metanal al 40%, comúnmente denominado como formalina o formaldehído), inmediatamente después de ser extraído del organismo. Así, se logra preservar su estructura y destruir microorganismos patógenos presentes.
- II. **Deshidratación:** La muestra se lava con agua destilada, y luego se deshidrata con una serie de soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes: etanol 70% → etanol 90% → etanol 96% → etanol 100%.
- III. **Aclaramiento:** Se sustituye el agente deshidratante (etanol) por una sustancia miscible (xilol) en el medio de inclusión para tejidos (MIT).
- IV. **Armado del bloque de MIT:** La muestra se sumerge en MIT fundido, se encastra en un molde, y se deja enfriar. Luego, el bloque obtenido se talla y empareja para formar el denominado taco.



- V. Corte con micrótopo: El taco se corta en finas rebanadas de entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ , mediante el uso de un micrótopo. Los cortes obtenidos se montan sobre portaobjetos.
- VI. Extracción de MIT: Para poder teñir los cortes histológicos, el MIT debe disolverse y extraerse nuevamente con xilol.
- VII. Hidratación: Los tejidos deben rehidratarse mediante el empleo de soluciones alcohólicas de concentración decreciente y finalmente agua destilada: etanol 100%  $\rightarrow$  etanol 96%  $\rightarrow$  etanol 80%  $\rightarrow$   $\text{H}_2\text{O}_{(d)}$ .
- VIII. Tinción: La muestra se sumerge en hematoxilina (colorante), se lava, se sumerge en eosina (colorante). Finalmente, se coloca en etanol 80%.
- IX. Deshidratación: La muestra se vuelve a deshidratar con etanol 96%  $\rightarrow$  etanol 100%  $\rightarrow$  etanol 100%. Luego, se hace pasar una última vez por xilol, para lograr un preparado permanente.
- X. Montaje: Se adhiere un cubreobjetos sobre un portaobjetos con la preparación teñida. Esta adhesión se lleva a cabo mediante la colocación de un medio de montaje, cuyas propiedades ópticas (índice de refracción similar al del vidrio, 1.518), permiten la visualización de la muestra bajo microscopio.



**Figura 1.1.** Preparación de cortes histológicos. **A)** Fijación, deshidratación, aclaramiento, y armado del bloque de medio de inclusión para tejidos (MIT). **B)** Corte, extracción de MIT, hidratación, tinción, deshidratación y montaje para posterior observación en microscopio. Los tiempos de cada etapa son variables. Se ejemplifica tinción más utilizada: hematoxilina-eosina.

### 1.1.6.2. Xilol como desecho de preparados histológicos

Mediante cromatografía de gases se encontró que el resultado del procedimiento histológico previamente descrito, es la contaminación de los xilenos tanto con MIT, como con etanol y restos de tejidos<sup>2</sup>. En los laboratorios de histología, los baños de solventes son re-utilizados a lo largo de varias inclusiones, pero los mismos tienen una vida útil limitada debiendo ser recambiados a lo largo de aproximadamente quince ciclos para evitar la pérdida de calidad de los cortes. De este modo se van generando desechos de solventes contaminados, siendo el xilol el de mayor preocupación debido a que no puede ser

descartado como desecho domiciliario y necesita un tratamiento especial como residuo peligroso para su disposición final. Esta disposición resulta costosa y difícilmente viable dado los escasos volúmenes que normalmente se generan a lo largo del año (aproximadamente veinticinco litros en instituciones regionales donde se llevan a cabo tareas destinadas a la investigación como en IMBECU, CONICET, Mendoza, Argentina), por lo que terminan siendo confinados en depósitos hasta disponer de un sistema seguro de desecho.

Adicionalmente, el xilol es uno de los solventes regulados y controlados por la Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico (SEDRONAR) y el Registro Nacional de Precursores Químicos (RENPRE), por lo que su uso y guarda deben ser cuidados y reportados con precisión a las autoridades competentes<sup>14,15</sup>.

#### ***1.1.6.3. Purificación de xilenos de preparados histológicos***

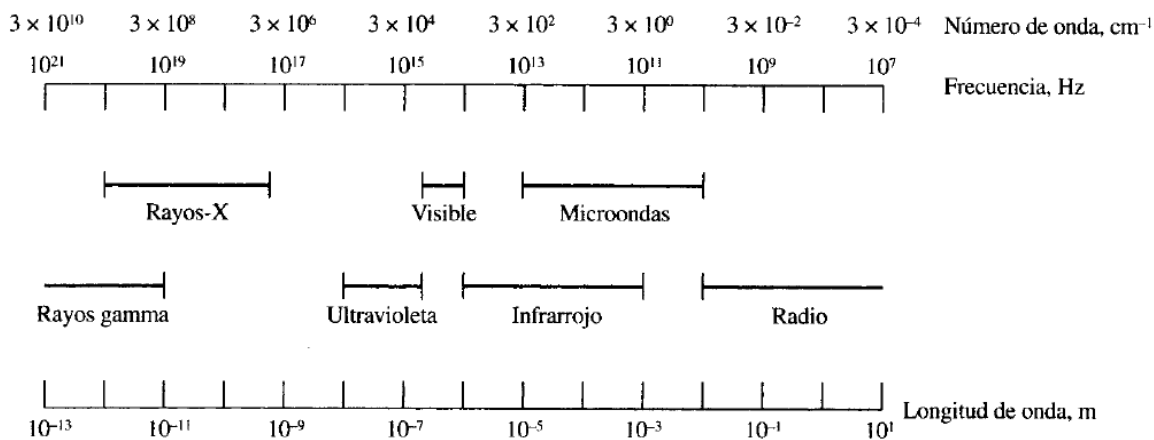
Debido a la acumulación de desechos de xilol de origen histológico y su compleja disposición final, surge la necesidad de reducir los volúmenes producidos tanto en el área de la salud pública o privada, como en el ámbito de la investigación<sup>2</sup>. Mediante la implementación de la destilación como medio de procesamiento de los desechos, no solo se alcanza este objetivo sino que también, se logra una recuperación del 90% al 95% del xilol, pudiendo ser reutilizado durante el proceso histológico<sup>2,16</sup>. Se ha demostrado que los desechos de xileno pueden ser recuperados efectivamente por destilación a presión atmosférica a temperaturas de ebullición entre 138 °C y 144 °C<sup>2</sup>, logrando en ocasiones, la obtención de un producto de mayor pureza que el adquirido comercialmente (presencia de etilbenceno)<sup>2,17</sup>; mientras que el etanol, sin embargo, requiere de destilación con aplicación de vacío para obtener el producto reciclado de calidad aceptable<sup>18</sup>.

Además de resultar beneficiosa para el medio ambiente, balances económicos indican que esta alternativa permite disminuir notablemente los costos tanto de compra del producto, como de disposición final del mismo<sup>2,17-19</sup>.

## 1.2. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO

### 1.2.1. Fundamentos

Las regiones del espectro electromagnético comprenden, en orden creciente de energías: ondas de radio, microondas, radiación infrarroja, visible, ultra violeta, rayos X y rayos  $\gamma$ . Estas regiones, junto con su correspondiente valor de frecuencia y número de onda, pueden observarse en la Figura 1.2.



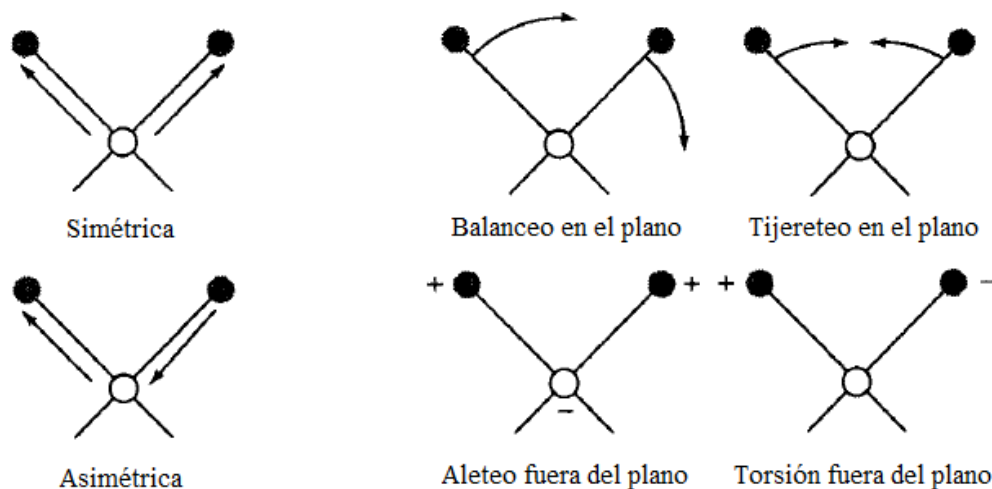
**Figura 1.2.** Regiones del espectro electromagnético.

En la zona del infrarrojo, se distinguen tres regiones espectrales: infrarrojo cercano (12800 a 4000 cm<sup>-1</sup>), medio (4000 a 200 cm<sup>-1</sup>) y lejano (200 a 10 cm<sup>-1</sup>). La región del infrarrojo medio es la más utilizada en mediciones espectrométricas<sup>20</sup>.

La espectrometría de infrarrojo se basa en las vibraciones de los átomos de las moléculas. La energía de esta radiación, no es suficientemente elevada para causar ionizaciones como sucede en el caso de los rayos X o  $\gamma$ .

Un espectro de infrarrojo se obtiene determinando qué fracción de la radiación infrarroja incidente en una muestra es absorbida a una energía en particular. La frecuencia de vibración de determinados grupos funcionales, define la energía a la cual se observa cierta señal en el espectro electromagnético. Para que una molécula pueda absorber radiación en la región del infrarrojo, el momento dipolar eléctrico de la misma debe cambiar como consecuencia de su vibración o rotación. Por comparación, una molécula diatómica homonuclear resulta inactiva en esta zona<sup>20,21</sup>.

Dos tipos básicos de vibraciones son los que producen señales en el espectro infrarrojo: tensión y flexión de enlaces. Una vibración de tensión o estiramiento, implica un cambio en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos. En la Figura 1.3 A se muestran los tipos de vibración de estiramiento: simétrica, si ambos átomos externos se alejan del átomo central, y asimétrica si uno se aleja y el otro se acerca<sup>20-22</sup>. Por otra parte, hay cuatro tipos de vibraciones de flexión, cuya característica común es que se modifica el ángulo entre dos enlaces. En la Figura 1.3 B se muestran los cuatro tipos de flexión: tijereteo, aleteo, torsión y balanceo<sup>20-22</sup>.



#### A. Vibraciones de tensión

#### B. Vibraciones de flexión

**Figura 1.3.** Tipos de vibraciones moleculares: **A.** Tensión, **B.** Flexión. El signo + indica movimiento del plano hacia el exterior de la página y - indica movimiento del plano hacia el interior de la misma.

### 1.2.2. Zonas de absorción en infrarrojo

En un espectro de infrarrojo, en general, se representa gráficamente el porcentaje de transmitancia [%], o la absorbancia (adimensional), en el eje de las ordenadas; mientras que en el eje de las abscisas se grafica la longitud de onda [ $\mu\text{m}$ ], o el número de onda [ $\text{cm}^{-1}$ ]. La representación gráfica escogida para los espectros analizados en este trabajo, muestra la absorbancia en función del número de onda.

Las principales zonas de absorción en el infrarrojo (definidas por intervalos de números de onda), de los distintos enlaces químicos presentes en los grupos funcionales, se muestran en la Tabla 1.3.<sup>20,22</sup>. Se puede observar, a través de las variaciones en los intervalos de número de onda, que existen diferencias energéticas para el mismo tipo de

enlace. Por ejemplo, el enlace C-H, dependiendo del grupo funcional al cual pertenece: alcanos, alquenos, alquinos, anillos aromáticos; registra señal de absorción a distintos números de onda.

**Tabla 1.3.** Zonas absorción en el infrarrojo [ $\text{cm}^{-1}$ ] de enlaces presentes en distintos grupos funcionales.

<b>C-H</b>	Alcanos	2850-2970
		1340-1470
<b>C-H</b>	Alquenos	3010-3095
		675-995
<b>C-H</b>	Alquinos	330
<b>C-H</b>	Anillos aromáticos	3010-3100
		690-900
<b>O-H</b>	Alcoholes y fenoles (monómeros)	3590-3650
<b>O-H</b>	Alcoholes y fenoles (unidos por puentes de hidrógeno)	3200-3600
<b>O-H</b>	Ácidos carboxílicos (monómeros)	3500-3600
<b>O-H</b>	Ácidos carboxílicos (unidos por puentes de hidrógeno)	2500-2700
<b>N-H</b>	Aminas, amidas	3300-3500
<b>C-C</b>	Alquenos	1610-1680
<b>C-C</b>	Anillos aromáticos	1500-1600
<b>C-C</b>	Alquinos	2100-2260
<b>C-N</b>	Aminas, amidas	1180-1360
<b>C-O</b>	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1050-1300
<b>C-O</b>	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690-1760
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitroderivados	1500-1570
		1300-1370

### **1.2.3. Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier**

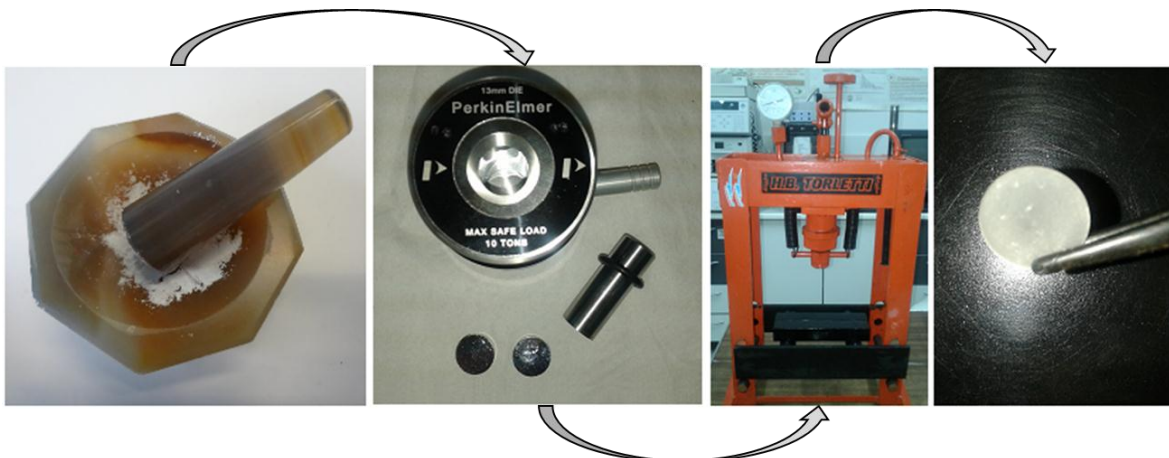
Tradicionalmente se empleaban instrumentos dispersivos para obtener espectros de infrarrojo. Con la disponibilidad de los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), se lograron importantes características: rapidez, sensibilidad, alta resolución, y precisión y exactitud de la longitud de onda. La mayoría de los instrumentos de FT-IR se basan en el interferómetro de Michelson como sistema óptico, mientras que la transformada de Fourier es un método matemático que se emplea para el tratamiento de los datos<sup>20,21</sup>.

### **1.2.4. Preparación de muestras**

La preparación de la muestra para un análisis por FT-IR es la instancia más compleja y que toma mayor tiempo. El material donde la muestra es soportada, idealmente debe ser transparente a la radiación infrarroja. Debido a que no existen solventes, o sustancias que sean transparentes en toda la región espectral de interés, es decir, que no generen una señal que pueda superponerse con la cualquier muestra, debe escogerse minuciosamente el material adecuado para cada una de ellas<sup>20</sup>.

#### ***1.2.4.1. Muestras sólidas***

El método más utilizado para el análisis de muestras sólidas es la realización de discos o pastillas que contengan los analitos de estudio (Figura 1.4). Consiste en el mezclado de la muestra sólida con haluro de álcali desecado y pulverizado. Comúnmente, para este fin, se hace uso del bromuro de potasio (KBr), que resulta completamente transparente en la región del infrarrojo medio. La mezcla de la muestra y KBr, se muele finamente en un mortero de ágata, se la introduce en un pastillero, el cual se somete a una presión de aproximadamente 10 toneladas. La presión aplicada durante el prensado, genera que la mezcla se sinterice, produciendo un disco transparente.



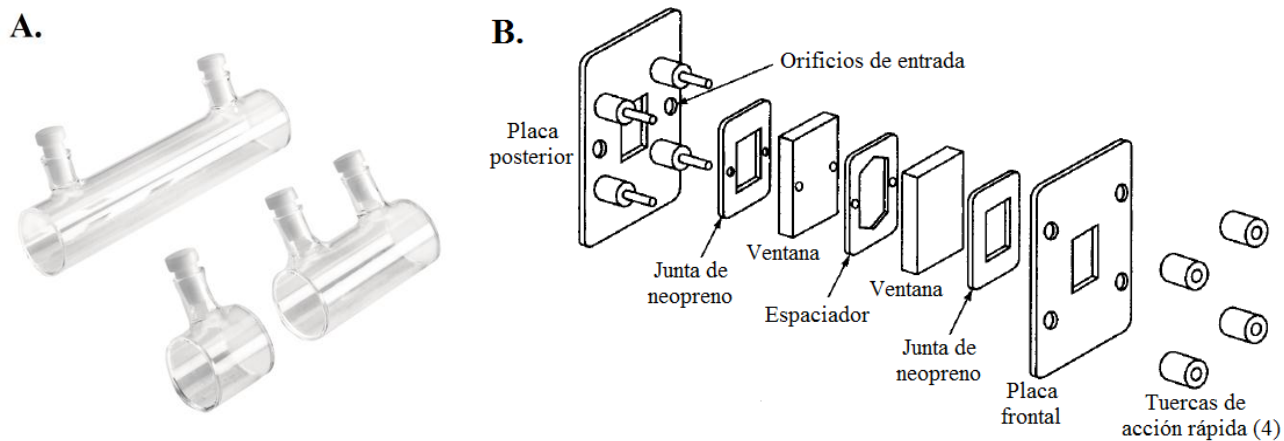
**Figura 1.4.** Preparación de muestras sólidas para análisis por FT-IR.

Deben tenerse en cuenta ciertos factores relevantes al preparar las pastillas. La relación de la cantidad de muestra con la de haluro alcalino debe ser pequeña, se recomienda mezclar entre 2 y 3 mg de muestra con aproximadamente 200 mg de la sal. El disco debe tener el grosor suficiente para poder ser manipulado con facilidad sin que se quiebre, debido a su fragilidad, y no debe ser demasiado grueso, porque dificulta la transmisión de la radiación<sup>21</sup>.

#### ***1.2.4.2. Muestras líquidas y soluciones***

Para el análisis de muestras líquidas se utilizan diferentes tipos de celdas. Comercialmente se dispone de celdas selladas con caminos ópticos fijos, y de celdas desmontables. Las primeras, poseen la desventaja de que no pueden ser desmontadas para su limpieza. Por otra parte, las celdas desmontables pueden ser desensambladas, y además, el camino óptico puede modificarse mediante la utilización de separadores de Teflon®, de espesor variable entre 0,015 y 1 mm<sup>20,21</sup>. En la Figura 1.5 se muestran las celdas mencionadas.





**Figura 1.5.** Celdas para líquidos para análisis por FT-IR. **A.** Selladas. **B.** Desmontables.

El material de la celda es de extrema importancia y se escoge en base a las propiedades de la muestra. Tiene que cumplir con dos requisitos fundamentales: debe ser transparente a la radiación infrarroja, y ser insoluble en el líquido a contener y su correspondiente solvente.

Otra alternativa rápida, es el empleo de películas líquidas (Figura 1.6). Este método, consiste en intercalar una gota de la muestra entre dos pastillas compuestas de un haluro de álcali. Ambas pastillas se mantienen unidas por capilaridad. Luego, la película líquida se monta en un soporte para llevar a cabo el análisis. Nuevamente, el grosor final obtenido no debe impedir o dificultar la transmisión de la radiación<sup>20,21</sup>.



**Figura 1.6.** Película líquida

### 1.2.5. Aplicaciones de la espectrometría de infrarrojo

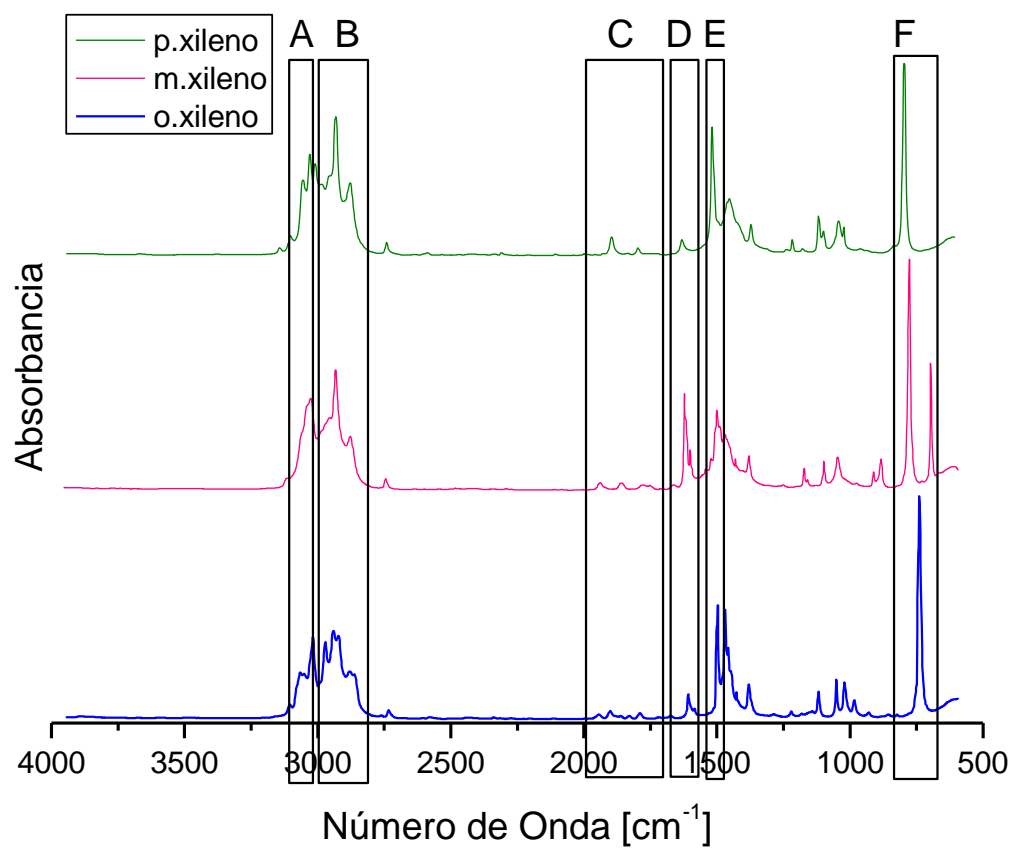
Toda especie molecular que no sea diatómica homonuclear absorbe en la región del infrarrojo, motivo por el cual prácticamente cualquier molécula orgánica o inorgánica puede ser analizada por este método.

La especificidad de los espectros obtenidos, encuentra utilidad en, por ejemplo, el análisis de mezclas de compuestos orgánicos y la determinación de contaminantes del aire<sup>20</sup>. Pueden identificarse moléculas poliméricas, y además, se aplica en el análisis de biomoléculas tales como lípidos, proteínas, péptidos, biomembranas, ácidos nucleicos, tejidos animales, células microbianas, plantas y muestras clínicas<sup>21</sup>.

El análisis por FT-IR resulta beneficioso también, para los seguimientos llevados a cabo durante la síntesis y/o purificación de compuestos químicos. En el presente trabajo, se hace uso de esta metodología durante el seguimiento de la purificación del xilol.

#### 1.2.5.1. Zonas características de espectros FT-IR de xilenos

Con el fin de poder identificar las señales generadas por XC en un espectro de infrarrojo, resulta necesario conocer los espectros originados por cada uno de los isómeros que componen la mezcla comercial. Los espectros de infrarrojo de los isómeros orto, meta y para xileno se muestran en la Figura 1.7<sup>23</sup>. En dichos espectros, se identifican con letras las zonas de absorción características de cada uno de ellos. Por otra parte, los grupos funcionales, el tipo de vibraciones que se ven involucradas, y el carácter del enlace asociado de las moléculas isoméricas de los xilenos se muestran en la Tabla 1.4. También, los números de onda a los cuales se registran señales de absorción de radiación electromagnética infrarroja media<sup>21,22</sup>.



**Figura 1.7.** Espectros FT-IR de isómeros orto-, meta- y para-xileno. Principales zonas de absorción identificadas en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Principales zonas de absorción en IR del xilol. Los valores numéricos corresponden a números de onda [ $\text{cm}^{-1}$ ].

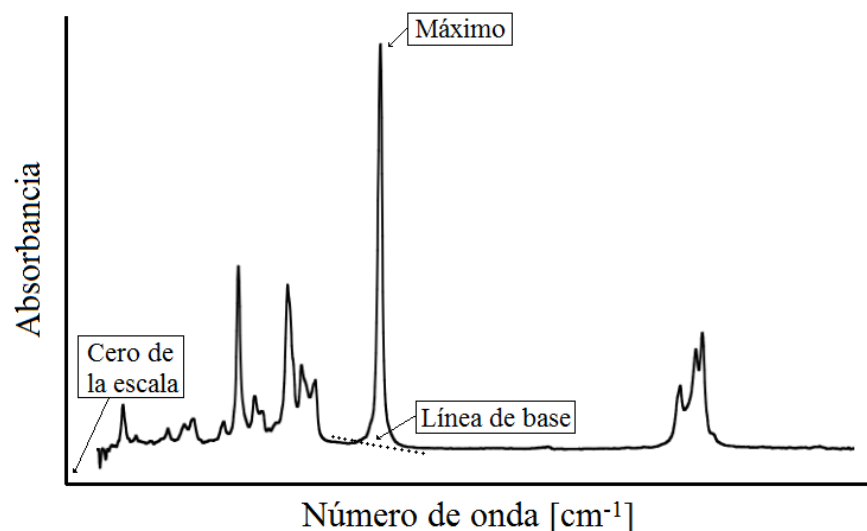
<b>Zona del espectro</b>	<b>A</b>	<b>B</b>			<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
<b>Carácter</b>	Aromático	Alifático			Aromático	Aromático	Aromático	Aromático
<b>Grupo funcional</b>	=CH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	Isómeros	-C=C-	-C=C-	=CH
<b>Estiramiento</b>	3000-3100	-	-	2900	-	1550-1700	1495	-
<b>Estiramiento asimétrico</b>	-	2940-2960	2930	-	-	-	-	-
<b>Estiramiento simétrico</b>	-	2860-2880	2850	-	-	-	-	-
<b>Bandas de combinación</b>	-	-	-	-	1700-2000	-	-	-
<b>Flexión del anillo</b>	-	-	-	-	-	-	-	680-820
<b>Identificación</b>	=CH Ar	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	-	Isom	C=C 1600	C=C 1495	=CH Flex
			CH Al					

## 1.2.6. Tratamiento de Espectros

Para extraer la información que ofrecen los espectros IR, se hace uso de una serie de técnicas generalizadas de las cuales haremos mención a continuación y que se utilizarán como herramienta de análisis en el presente trabajo.

### 1.2.6.1. Corrección de línea de base

Consiste en tomar la diferencia de absorbancia entre el valor máximo del pico y la base del mismo (valores donde la absorbancia es mínima), en lugar del cero de la escala<sup>21,6</sup>. Ver Figura 1.8.



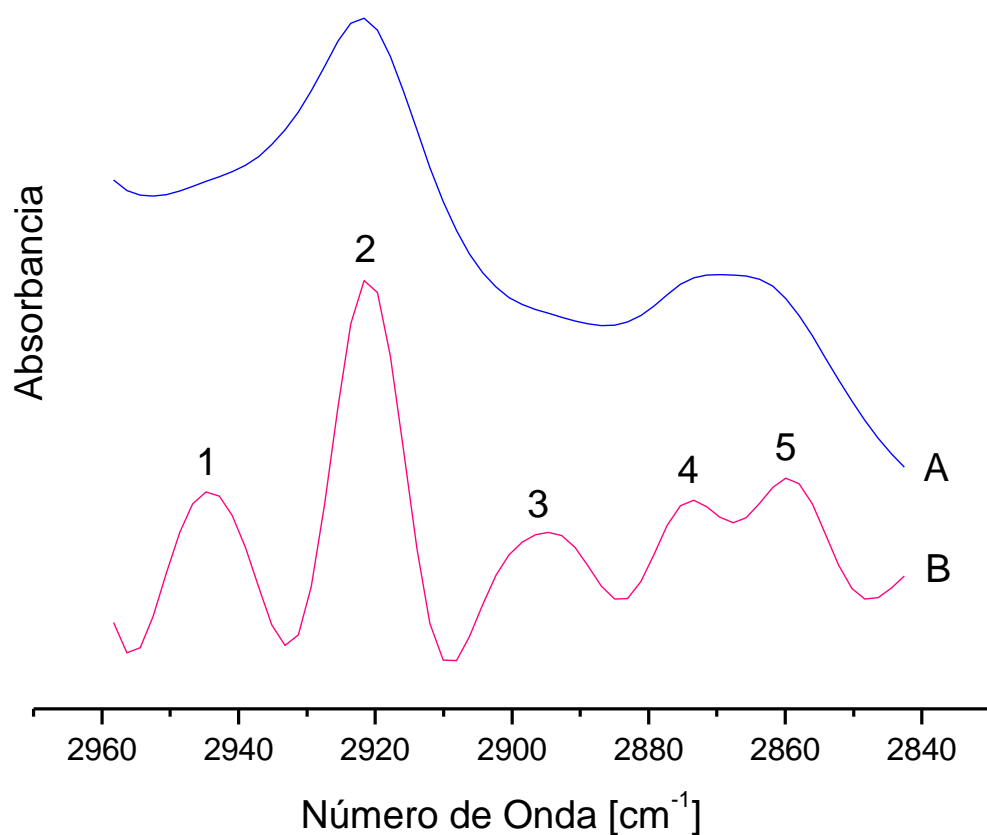
**Figura 1.8.** Corrección de línea de base

### 1.2.6.2. Deconvolución

La deconvolución, es un proceso implementado para resolver picos superpuestos que no han podido resolverse instrumentalmente. Esta técnica, produce espectros que tienen bandas mucho más estrechas, y es capaz de distinguir características reducidamente espaciadas, mejorando significativamente la capacidad de diferenciarlas en el espectro<sup>21</sup>.

En el presente trabajo se hace uso de la autodeconvolución de Fourier<sup>24</sup>. Como consecuencia, se logran identificar los picos de absorción correspondientes a los grupos funcionales metilo, metileno y metino, que en los espectros de FT-IR aparecen a números de onda entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$ , como una combinación de los mismos. La selección de los

parámetros en la autodeconvolución de Fourier, en este caso, se basa en la obtención de cinco picos característicos, correspondientes a los estiramientos simétricos y asimétricos de metileno y metilo, y al estiramiento del enlace C-H del metino. En la Tabla 1.4, se pueden observar las zonas de absorción características de los mismos, mientras que, en la Figura 1.9, se muestra un espectro FT-IR en la zona de absorción de C-H alifático, antes y después de aplicar la autodeconvolución de Fourier.



**Figura 1.9.** Zona de estiramiento C-H alifático de espectro FT-IR de xilol puro (A) antes y (B) después de la autodeconvolución de Fourier. Estiramientos: (1) asimétrico  $\text{CH}_2$ , (2) asimétrico  $\text{CH}_2$ , (3)  $\text{CH}$ , (4) simétrico  $\text{CH}_3$  y (5) simétrico  $\text{CH}_2$ .

## **1.3. QUIMIOMETRÍA**

### **1.3.1. Definición y aplicaciones**

“La quimiometría es una disciplina química que utiliza matemática, estadística y lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, para proveer la máxima información química relevante analizando datos químicos, y para conocer sistemas químicos”<sup>25</sup>.

Uno de los aspectos más relevantes de la quimiometría es la aplicación del análisis multivariado a datos químicos. El análisis estadístico multivariado, es una poderosa herramienta para analizar y estructurar conjuntos de datos obtenidos de sistemas en estudio, y para generar modelos matemáticos empíricos que son, por ejemplo, capaces de predecir valores de importantes propiedades que no pueden ser medidas directamente. Problemas típicos que pueden ser abordados con éxito, por métodos quimiométricos son: determinación de la concentración de cierto componente en una mezcla compleja, clasificación de muestras según su origen, predicción de propiedades o actividad química de compuestos, reconocimiento de presencia o ausencia de subestructuras en la estructura química de un compuesto orgánico desconocido y evaluación del estado de un proceso químico tecnológico, entre otros<sup>26</sup>.

### **1.3.2. Análisis estadístico multivariado**

La estadística multivariada es una extensión de la estadística univariada. La estadística univariada investiga independientemente cada variable, o relaciona una sola variable independiente a una variable dependiente. Es conocido que, en el área de la química, los procesos bajo análisis son de naturaleza multivariada, lo que significa que una buena caracterización requiere de varias variables. El análisis multivariado, considera varias variables en simultáneo.

Numerables situaciones muestran que una aproximación multivariada, puede resultar satisfactoria incluso en casos donde consideraciones univariadas son completamente útiles<sup>26</sup>. La ventaja del análisis multivariado se basa en que un número importante de variables independientes permite obtener mucha más información sobre una

muestra, si el conjunto es tratado adecuadamente. Mientras que el uso de una sola señal o un solo valor de la variable independiente, produce una importante pérdida de información que resulta relevante<sup>27</sup>.

### 1.3.3. Parámetros estadísticos

La aplicación de metodologías de clasificación multivariada al tratamiento de datos analíticos, requiere que el analista conozca en profundidad tanto el sistema analítico en estudio, así como también los fundamentos matemáticos del método, para que los resultados sean interpretados apropiadamente. Para describir completamente los métodos de análisis multivariado, se hace necesaria la comprensión del álgebra matricial<sup>28</sup>. En la Tabla 1.5, se detallan algunos elementos matemáticos básicos que son utilizados habitualmente en la realización de un análisis estadístico multivariado.

**Tabla 1.5.** Principales parámetros estadísticos, ecuaciones e interpretación de los mismos.

Parámetro	Ecuación	Interpretación
Varianza	$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$	Medida de la dispersión de los valores que toman las variables respecto a la media de los mismos
Desviación estándar	$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$	Raíz cuadrada de la varianza, expresa la medida de la dispersión en las mismas unidades que poseen los datos
Covarianza	$\sigma_{x,y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1}$	<p>Estima la variación conjunta de dos variables aleatorias:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dependencia directa si <math>\sigma_{x,y} &gt; 0</math></li> <li>• No existe relación lineal entre las dos variables si <math>\sigma_{x,y} = 0</math></li> <li>• Dependencia inversa si <math>\sigma_{x,y} &lt; 0</math></li> </ul>
Coefficiente de correlación de Pearson	$r = \frac{\sigma_{x,y}}{\sigma_x \sigma_y}$	<p>Medida adimensional de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas, varía entre -1 y 1, si:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>r = 1</math> correlación positiva perfecta</li> <li>• <math>0 &lt; r &lt; 1</math> correlación positiva</li> <li>• <math>r = 0</math> no existe relación lineal</li> </ul> <p>No necesariamente implica que las variables son independientes: pueden existir relaciones no lineales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>-1 &lt; r &lt; 0</math> correlación negativa</li> <li>• <math>r = -1</math> correlación negativa perfecta</li> </ul>

$\bar{x}$ : valor medio de la variable;  $n$ : cantidad de valores que toma la variable



### 1.3.4. Análisis de componentes principales (PCA)

Un problema con los datos multivariados, es que se dificulta ver patrones, y relaciones. Por ejemplo, un espectro de infrarrojo, posee numerosas mediciones de absorbancia. Por lo tanto, el objetivo de muchos métodos de análisis multivariado es la reducción de datos. Con bastante frecuencia, existe cierta correlación entre las variables, por lo que parte de la información puede resultar redundante. El análisis de componentes principales (PCA), es una técnica para reducir la cantidad de datos cuando hay correlación presente. Además, es utilizado frecuentemente para la clasificación de sistemas predefinidos de conjuntos de muestras, de las cuales se conoce su composición química o alguna propiedad analítica relevante<sup>28</sup>. En otras palabras, el empleo de PCA permite evaluar los resultados analíticos con el fin de hallar propiedades desconocidas, así como también relaciones entre las variables en estudio, basándose en el conocimiento del sistema.

La idea detrás del PCA, es encontrar componentes principales  $Z_1, Z_2, \dots, Z_n$ , que sean combinaciones lineales de las variables originales  $X_1, X_2, \dots, X_n$  que describen cada muestra:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n$$

$$\vdots = \quad \vdots + \quad \vdots + \quad \vdots + \quad \vdots + \quad \vdots$$

$$Z_n = a_{n1}X_1 + a_{n2}X_2 + a_{n3}X_3 + \dots + a_{nn}X_n$$

Los coeficientes,  $a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1n}$  son elegidos para que las nuevas variables, a diferencia de las variables originales, no estén correlacionadas entre sí. Crear un nuevo conjunto de variables de esta manera, puede parecer un ejercicio inútil puesto que obtenemos  $n$  nuevas variables en lugar de las  $n$  originales, y por lo tanto no se ve reducida la cantidad de datos. Sin embargo, también se eligen los componentes principales de manera que el primer componente principal (PC1),  $Z_1$ , representa la mayor parte de la variación en el conjunto de datos, el segundo (PC2),  $Z_2$ , explica la siguiente variación más grande y así sucesivamente.

Por lo tanto, cuando se produce una correlación significativa, el número de PC útiles es mucho menor que el número de variables originales<sup>28</sup>.

El PCA realiza una manipulación matemática de la matriz de datos, donde el objetivo es representar la variación presente en algunas variables, empleando un pequeño número de PC. Los componentes principales se obtienen a partir de la matriz de covarianza, y forman ángulos rectos entre sí. Esta propiedad, se conoce como ortogonalidad. En términos matemáticos, los componentes principales, son los autovectores de la matriz de covarianza, y la técnica para encontrar estos autovectores, se denomina autoanálisis. A cada componente principal (autovector), le corresponde un autovalor, que indica la varianza de los datos que es explicada por esa componente principal<sup>28</sup>.

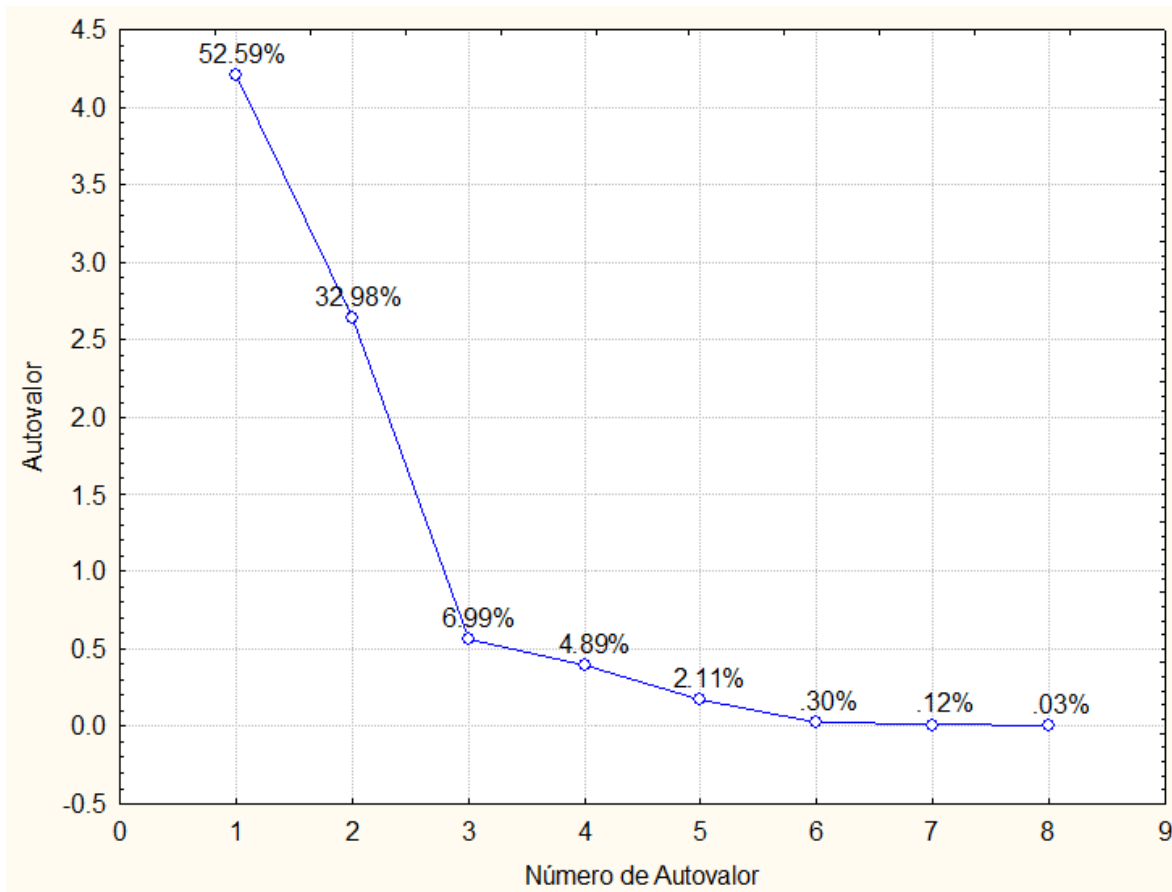
A veces, es posible dar una interpretación física a los componentes principales. Por este motivo, suele referirse a los componentes principales como variables latentes u ocultas. En otros casos, se encuentra que algunas variables no contribuyen significativamente, incluso con la PC1, un importante beneficio del PCA es que dichas variables pueden ser descartadas.

Por otra parte, se pueden graficar las muestras empleando un nuevo espacio definido por las componentes principales. PC1 se encontrará en la dirección de máxima variación de las variables originales, PC2 estará en la dirección de la siguiente máxima variación, y así subsecuentemente<sup>28</sup>. Los nuevos ejes definidos como las componentes principales, permiten al analista probar la matriz de datos, y poder observar la naturaleza multivariada de los mismos, en un número reducido de dimensiones. Con esta nueva visión, se logra reconocer el modelo, e identificar estructuras en los datos.

#### ***1.3.4.1. Análisis de resultados mediante PCA***

Los resultados obtenidos tras la realización de un PCA, permiten identificar claramente la distribución y agrupamiento de datos, y analizar la dependencia que tienen las componentes principales con las variables en estudio.

- Determinación del número de componentes principales: Existen algunos criterios para determinar el número de componentes principales a retener, uno de ellos es conservar aquellas componentes cuyos autovalores sean superiores a 1. Otro, consiste en representar un gráfico de autovalores en función del número de componentes principales (scree plot), y considerar el número de componentes en el que el descenso se estabiliza. En la Figura 1.10, puede observarse como ambos criterios convergen en la elección de dos componentes principales. Un tercer criterio, que es el utilizado en el presente trabajo, consiste en la elección de la cantidad de componentes principales que expliquen un porcentaje de varianza de los datos, mayor al 90%. En la Figura 1.10 esto se cumple al escoger tres componentes principales para describir el modelo.



**Figura 1.10.** Gráfico de autovalores en función del número de autovalor. Las cantidades asociadas a cada punto corresponden a los porcentajes de varianza de los datos, explicados por cada uno de los autovalores. *Aclaración: el software utilizado posee formato de texto en inglés por lo cual, las comas aparecen como puntos.*

- Gráfico de scores: El gráfico de scores, o de proyección de las variables originales sobre las componentes principales, expone el comportamiento de cada muestra respecto a los mismos. La ubicación de las muestras depende de sus características, es decir, si existieran subgrupos de muestras con diferentes características entre sí, se lograría reconocer dichas diferencias, permitiendo generar una clasificación.
- Gráfico de loadings: El gráfico de loadings, describe el comportamiento de las propias variables originales en las componentes principales. Esto es, aquellas variables que poseyeran fuerte influencia sobre las PC, se encontrarían ubicadas en el gráfico alejadas del cero, mientras que aquellas cuya influencia fuese nula o escasa, se hallarían cerca de él.
- Matriz de varianza: La matriz de varianza de los datos, permite determinar el grado de dispersión de los datos originales sobre las PC. Una elevada dispersión puede deberse a una incorrecta selección de variables, a un número elevado de componentes principales, o simplemente, a la variabilidad de los datos originales.

Es importante tener en cuenta que, si se seleccionaran un número elevado de componentes principales, el modelo se ajustaría adecuadamente, pero teniendo incorporada información que resultaría irrelevante, cayendo en un sobreajuste, y obteniendo errores aleatorios. En el polo opuesto, se puede correr el riesgo de no considerar información importante si la cantidad de PC se viera disminuida en exceso, confluyendo en un subajuste, introduciendo errores sistemáticos<sup>29</sup>.

### **1.3.5. Análisis de la varianza (ANOVA)**

El análisis de la varianza (ANOVA), surge como una generalización del contraste estadístico para dos medidas, cuando el número de muestras a contrastar es mayor a dos.

Se utiliza el nombre de análisis de la varianza, ya que el elemento básico del análisis estadístico es precisamente, el estudio de la variabilidad. Si mediante los contrastes estadísticos adecuados, la variación producida por cierto factor, es significativamente mayor que la producida por el error experimental, se puede aceptar la hipótesis de que los

distintos niveles del factor actúan de forma diferente<sup>30</sup>. En la Tabla 1.6 se muestran los parámetros incluidos en el ANOVA realizado en este trabajo.

Por medio del ANOVA se plantean dos hipótesis:

- Hipótesis nula: La media de todos los conjuntos de datos son iguales.
- Hipótesis alternativa: Las medias de uno o más conjuntos de datos seleccionados son diferentes.

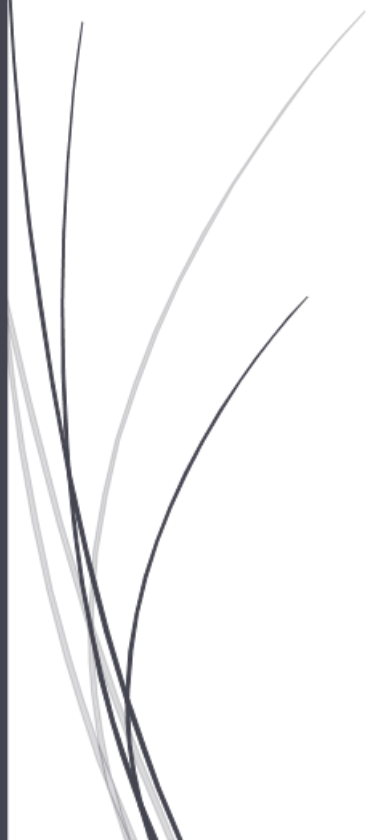
**Tabla 1.6.** Notación relativa al modelo, y respectivos significados.

<b>n</b>	Número de observaciones
$\bar{x}$	Media muestral de todas las observaciones
$\sigma$	Desviación estándar
<b>F</b>	<p>F de Fisher: Se considera la razón de dos varianzas, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar. La cantidad calculada F está dada por:</p> $F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$ <p>La hipótesis nula adoptada es que las poblaciones de donde se toman las muestras sean normales, y que sean iguales las varianzas<sup>28</sup>.</p>
<b>p</b>	<p>Medida de significación estadística. Con un 95% de confianza, se establece que si <math>p &lt; 0,05</math>, se rechaza la hipótesis nula, determinando que las medias de los conjuntos de datos son significativamente diferentes. Por el contrario, si <math>p &gt; 0,05</math> se acepta la hipótesis nula, y las medias de los conjuntos son no significativamente diferentes.</p>



# CAPÍTULO II

## EXPERIMENTAL



## **CAPÍTULO II**

### **2. EXPERIMENTAL**

#### **2.1. MATERIALES Y REACTIVOS**

A continuación, se detallan los materiales y reactivos que fueron utilizados para llevar a cabo la etapa experimental.

Las pastillas para el análisis por FT-IR, se prepararon con bromuro de potasio pro-análisis marca Tetrahedron (Argentina), pureza 98,5%. Previamente, fue desecado en una mufla, cuya temperatura fue en aumento hasta alcanzar 400 °C, se mantuvo durante una hora, y luego se dejó enfriar. El tiempo total aproximado fue de una hora. Además, el KBr fue molido finamente, tamizado y almacenado en desecador. Xilol marca Biopack (Argentina), con pureza del 99,9%, fue utilizado como referencia de XC. Se usó cloruro de sodio de grado analítico marca Anedra (EE. UU.), con 99% de pureza.

#### **2.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA, SOFTWARE Y EQUIPOS MENORES**

A lo largo de la realización de este trabajo se hizo uso de instrumentos de análisis (espectrómetro de FT-IR), y también de los que se denominan equipos menores (centrífuga, balanza y vórtex, entre otros). Los detalles técnicos de cada uno de ellos, su procedencia, y las condiciones de uso se enuncian a continuación.

##### **2.2.1. Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)**

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos con un espectrómetro Spectrum BX FT-IR System marca Perkin Elmer (EE. UU.), con interferómetro DynaScan y detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS). Posee un láser Helio Neón (HeNe) de clase II categorizado por el Centro de Dispositivos y Salud Radiológica (CDRH)<sup>31</sup>, que emite radiación continua y visible a una longitud de onda de 633 nm. El sistema óptico permite un rango de barrido de 7800 a 100  $\text{cm}^{-1}$  con resolución máxima de 1  $\text{cm}^{-1}$ . El sistema electrónico está basado en el procesador integrado Motorola 68340. Ventanas de KBr separan el compartimento de muestras del sistema óptico manteniéndolo purgado, libre de

humedad y de dióxido de carbono<sup>32</sup>. En la Figura 2.1 se muestra una imagen del espectrómetro FT-IR utilizado mientras se obtiene un espectro de xilol.



**Figura 2.1.** Espectrómetro FT-IR

### **2.2.2. Prensa hidráulica**

Para aplicar presión sobre el pastillero, se empleó una prensa hidráulica (Figura 2.2) marca H. B. Torletti (Argentina) con rango de presión de 0 a 20 toneladas y sensibilidad de 0,5 toneladas.

### **2.2.3. Pastillero**

Para preparar las pastillas, se hizo uso de un pastillero Perkin Elmer (EE. UU.), de 13 mm de diámetro interno (Figura 2.3), cuyo límite máximo de seguridad es de 10 toneladas de presión.



**Figura 2.2.** Prensa Hidráulica.





**Figura 2.3.** Pastillero Perkin Elmer de 13 mm de diámetro interno.

#### **2.2.4. Equipo de destilación**

El equipo de destilación consta de un manto calefactor Arcano (Argentina) MCS 500 mL con rango de programación de temperatura de 5 °C a 320 °C, una columna Vigreux y un balón de destilación marca Industria Vidriera Argentina (IVA) de 600 mm de longitud y 250 mL de capacidad, respectivamente. Además, se utilizaron un termómetro de vidrio de mercurio marca B & C Germany (Alemania) de 300 mm de largo con rango de temperatura de -10 a 250 °C, con una sensibilidad de 2 °C , y un tubo refrigerante Pyrex tipo Friedrichs de 350 mm de longitud marca IVA.

#### **2.2.5. Centrífuga**

La centrífuga de mesa empleada es marca Luguimac (Argentina) modelo LC-15, con rango de programación del tiempo de 0 a 99 minutos. Rotor CL-0450. El radio del rotor más el adaptador es de 150mm, y el rango de programación de la velocidad es de 0 a 3600 rpm (0 a 2177 g). Cada uno de los cuatro adaptadores A14-1615 tiene una capacidad para cuatro tubos de plástico o de vidrio para centrífuga de 15 mL de volumen (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Centrífuga de mesa

### 2.2.6. Mufla

Se utilizó una mufla ORL (Argentina) con controlador de temperatura Dhacel DH100 para desecar el bromuro de potasio empleado en las pastillas. La temperatura máxima que puede ser alcanzada por la misma es de 1250 °C con resolución de 1 °C. El KBr obtenido se almacenó en desecador.

### 2.2.7. Micropipeta

Las muestras fueron tomadas con una micropipeta de marca Kartell (Italia) modelo PL 100 con rango de medición de 10 µL a 100 µL. Ver Figura 2.5.

### 2.2.8. Balanza

Se utilizó una balanza analítica AND (EE. UU.), modelo HR-200 con una capacidad de 210 g y sensibilidad de 0,0001 g. El tamaño del plato es de 85 mm de diámetro (Figura 2.6).



Figura 2.5. Micropipeta P100



Figura 2.6. Balanza analítica AND



Figura 2.7. Vórtex Boeco

### 2.2.9. Vórtex

Para agitar las muestras se utilizó un vórtex marca Boeco (Alemania), modelo V1 (Figura 2.7). Presenta un rango de velocidad de 2 a 150 g con un tiempo de aceleración de 3 s. La capacidad de los tubos es de 1,5 a 50 mL.

### 2.2.10. Material del vidrio y mortero de ágata

Se dispuso de material de vidrio no volumétrico como embudos, frascos de entre 30 y 1000 mL de capacidad para almacenar las muestras en cada etapa, ampolla de decantación de 500 mL de capacidad, pipetas Pasteur para colectar fracciones de centrifugación, y vasos de precipitado de 250 mL y de 10 mL.

El material de vidrio volumétrico utilizado fue una probeta de 500 mL y tubos de centrífuga y, por último, material de precisión como matraces aforados de 25 mL de capacidad y pipeta de doble aforo de 1 mL de capacidad.

Para moler finamente el KBr y mezclarlo con la muestra, se hizo uso de un mortero de ágata de 60 mm de diámetro. El mortero se muestra en la Figura 2.8.



**Figura 2.8.** Mortero de ágata.

### 2.2.11. Software

Los espectros de FT-IR se obtuvieron mediante el uso del programa SPECTRUM v5.3.1 y el análisis de los mismos se llevó a cabo con OMNIC 7.3. ORIGIN 7.0 fue utilizado para procesar datos de los espectros y para realizar ANOVA. Para el Análisis de Componentes Principales (PCA), se utilizó el programa STATISTICA 7.0.

## **2.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO**

En el presente trabajo se propusieron dos caminos alternativos como posibles medios de purificación de la muestra de partida. La muestra de partida de histología (denominada como MPH) consistió en el xilol proveniente de baños de estudios de histología. Es decir, mezcla de xilenos que se almacenan como desecho tras agotar su poder desparafinizante. Uno de los métodos se basó en una centrifugación, bajo distintas condiciones experimentales que favorecieran la separación de fases y por consiguiente, la purificación del xilol. El segundo método consistió en llevar a cabo una destilación fraccionada bajo temperatura controlada.

Con el objeto de purificar la MPH, se evaluó la efectividad de las metodologías propuestas: centrifugación y destilación. Para alcanzar tal fin, se realizó un seguimiento analítico del proceso de purificación, mediante el empleo de FT-IR. El análisis integral de los resultados, se llevó a cabo mediante el uso de PCA como herramienta estadística.

En las siguientes secciones se dará a conocer en detalle la metodología de trabajo aplicada en cada uno de los procedimientos mencionados.

### **2.3.1. Muestras de referencia**

Se tomaron tres alícuotas de cada una de las muestras correspondientes tanto al XC, como a la MPH y se les efectuaron los correspondientes análisis por medio de FT-IR. Las muestras de XC se tomaron como referencia del producto final que se desea obtener. Por otra parte, en base a los datos obtenidos mediante MPH, se pueden analizar los posibles efectos de cada una de las metodologías aplicadas.

### **2.3.2. Decantación**

En una ampolla de decantación de 500 mL, medidos con una probeta, se introdujeron 400 mL de la MPH. Alrededor de la misma se colocó un recipiente plástico, se lo llenó con hielo en escamas y se dejó en reposo durante 30 minutos. Luego de retirarse el baño de hielo, se descartó la fase inferior y se almacenó la superior para ser empleada en etapas posteriores.

### 2.3.3. Centrifugación

Cada centrifugación se llevó a cabo, mediante el agregado en un tubo de centrífuga de una alícuota de 10 mL de la fase superior orgánica obtenida tras la decantación. Los tubos se numeraron de C1 a C6. A los tubos C1, C2 y C3 no se les añadió NaCl. A los tubos C4, C5 y C6 se les agregaron 500 mg de NaCl y se agitaron en el vórtex durante 30 segundos a aproximadamente 40 g. Ambos grupos de muestras se colocaron en un baño de hielo durante 10 minutos y luego se centrifugaron. En la Tabla 2.1 se enuncian las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo los ensayos de centrifugación. Por un lado se varió la velocidad, y por el otro la presencia o ausencia de sal, para analizar el posible efecto de cada una de ellas.

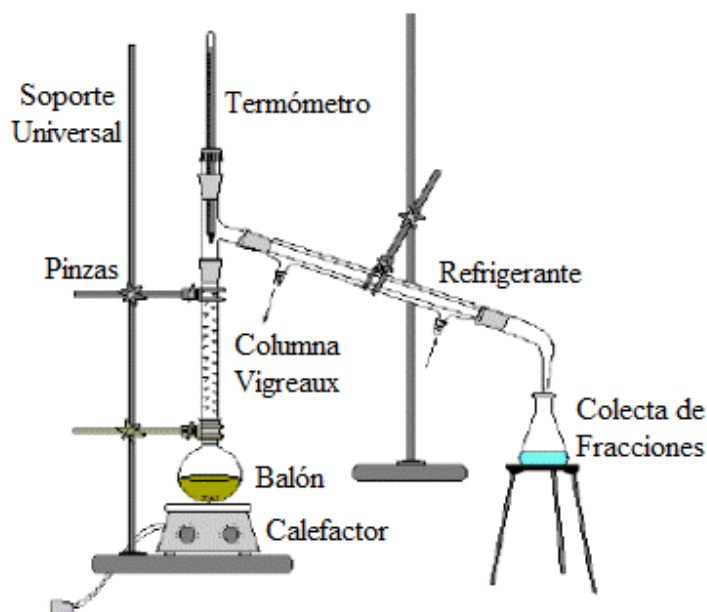
**Tabla 2.1.** Condiciones de centrifugación de MPH.

Muestra	Tiempo [min]	Velocidad [g]	NaCl [mg]
C1	15	284	0
C2	15	378	0
C3	15	486	0
C4	15	284	500
C5	15	378	500
C6	15	486	500

Al finalizar la centrifugación, la fase orgánica de cada tubo se extrajo con pipetas Pasteur, y se almacenó para su posterior análisis por FT-IR.

### 2.3.4. Destilación fraccionada

Para proceder con la destilación, se tomaron con una bureta 150 mL de la fase obtenida mediante la decantación, y se colocaron en un balón de 250 mL. Luego se armó el equipo de destilación como se muestra en la Figura 2.1. Por otra parte, se rotularon y pesaron cinco matraces de 25 mL con sus tapones, uno para cada fracción y el último para la cola de destilación.



**Figura 2.9.** Esquema de equipo de destilación fraccionada.

Durante la destilación se colectaron, en cada uno de los matraces, las correspondientes fracciones. En primer lugar, se obtuvo la cabeza de destilación de 25 mL, denominada como fracción 0. A continuación se colectaron, sin interrupción, el resto de las fracciones de 25 mL, hasta obtener la fracción 3. Tras consumir el proceso, se dejó enfriar el sistema.

Mientras tanto, se pesaron los matraces con sus correspondientes fracciones, se les calculó la densidad, y se las almacenó en frascos de vidrio rotulados del 0 al 3. Con el último matraz, se tomaron 25 mL del remanente del contenido del balón denominado como cola, ya a temperatura ambiente, y se pesaron para realizar el cálculo de densidad.

Finalmente, se obtuvo una nueva muestra, denominada como mezcla de fracciones de destilación (MFD). Para generar esta mezcla, se tomó 1 mL de cada una de las tres fracciones de destilación (1, 2 y 3) con una pipeta de doble aforo y se colocaron dentro de un nuevo frasco contenedor.

Se llevó a cabo una repetición del procedimiento completo previamente descrito obteniendo datos correspondientes a dos destilaciones, la primera llamada A y la segunda B. Las muestras se analizaron por triplicado, obteniendo tres espectros de FT-IR de cada una de ellas.

### 2.3.5. Pastillas de bromuro de potasio

Para preparar las pastillas de cada una de las muestras, se colocaron 200 mg de KBr en el mortero de ágata, y se añadieron 36  $\mu\text{L}$  de cada muestra, tomados con micropipeta. Ambos se molieron, se introdujeron en el pastillero, y se les aplicó una presión de 10 toneladas durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se extrajeron las pastillas del molde (Figura 2.10).



**Figura 2.10.** Pastilla de KBr

Las pastillas que se utilizaron como blanco, se prepararon de la misma manera que las correspondientes a las muestras, pero sin el agregado de las mismas.

### 2.3.6. Adquisición de espectros FT-IR

Luego de montar las pastillas en el espectrómetro, se obtuvieron los espectros bajo las siguientes condiciones: el rango de barrido fue de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  y la resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente a haber obtenido el espectro de cada una de las muestras, se corrigieron los espectros respecto al blanco, mediante el cociente entre los espectros de las muestras con solvente, y el espectro del blanco de bromuro de potasio. Cada día de trabajo, se realizó una nueva pastilla de KBr para corregir las contribuciones de humedad y dióxido de carbono del ambiente de los espectros de las muestras.

### 2.3.7. Tratamiento de espectros FT-IR

La información contenida en los espectros obtenidos mediante FT-IR fue procesada y extraída mediante la utilización, según la zona del espectro, de las técnicas implementadas como herramientas de análisis que se detallan a continuación.

#### 2.3.7.1. Corrección de línea de base

La corrección de línea de base automática se aplicó a la zona de estiramiento C-H alifático y aromático comprendida entre los números de onda de 3100 y 2800  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.7.2. Autodeconvolución de Fourier

Los picos correspondientes a metilenos, metinos y metilos de la zona de C-H alifático se obtuvieron mediante la aplicación de la autodeconvolución de Fourier en el intervalo comprendido entre 2980 y 2830  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.7.3. Análisis semicuantitativo: cocientes de áreas

Los espectros obtenidos del análisis por FT-IR proporcionaron información sobre los grupos funcionales presentes descritos en la Tabla 1.4. A partir de los mismos, se pudieron obtener datos semicuantitativos mediante la realización de cocientes entre las áreas de las zonas características del espectro. Dichos cocientes resultan comparables con los obtenidos de otros espectros. Esta metodología de procesamiento de señales analíticas es una ventaja cuando, como en este caso, no se dispone de patrones para realizar curvas de calibrado. Adicionalmente permite hacer correcciones de los espectros entre pastillas analizadas disminuyendo la variabilidad de la señal analítica entre dichas pastillas. En la Tabla 2.2 se enuncian y explican los cocientes de áreas que se involucraron en el análisis estadístico como variables.

**Tabla 2.2.** Cocientes de áreas obtenidos de espectros de IR e interpretación de los mismos. La identificación de las zonas involucradas se mostró en la Tabla 1.4.

Relación de áreas	Región del espectro [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Interpretación de relaciones
$\frac{\text{CH}_2}{\text{CH}_3}$	$\frac{1930 + 2850}{(2960 \text{ a } 2940) + (2880 \text{ a } 2860)}$	Relación metileno/ metilo ( $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ). Este cociente se relaciona con la longitud de cadena alifática y su grado de ramificación <sup>33,34</sup> . Mientras mayor es la relación $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ más largas y menos ramificadas son las cadenas hidrocarbonadas.
$\frac{= \text{CH Ar}}{\text{CH Al}}$	$\frac{3100 \text{ a } 3000}{3000 \text{ a } 2800}$	Relación estiramiento CH aromático/CH Alifático. La contribución relativa de modos de estiramiento C-H aromático con respecto a bandas de estiramiento C-H alifático. Indicador de grado de aromaticidad.



$\frac{\text{CH Al}}{\text{C} = \text{C} 1600}$	$\frac{3000 \text{ a } 2800}{1700 \text{ a } 1550}$	Relación estiramiento CH alifático/C=C 1600. Contribución relativa de bandas de estiramiento alifático C-H a grupos de carbonos aromáticos C=C. Valores más altos indican aumento de grupos alifáticos respecto a grupos de carbono aromático. Esta relación es equivalente al índice I1 de Guo y Bustin <sup>35</sup> .
$\frac{\text{Factor A} = \frac{\text{CH Al}}{\text{CH Al} + \text{C} = \text{C} 1600}}{\text{CH Al} + \text{C} = \text{C} 1600}$	$\frac{3000 \text{ a } 2800}{(3000 \text{ a } 2800) + (1700 \text{ a } 1550)}$	Contribución relativa de las bandas de estiramiento C-H alifáticas a la suma de estiramiento C-H alifático y estructuras de carbono aromático. Según Ganz y Kalkreuth <sup>36</sup> representa el cambio en la intensidad relativa de los grupos alifáticos.
$\frac{\text{C} = \text{C} 1495}{\text{C} = \text{C} 1600}$	$\frac{1495}{1700 \text{ a } 1550}$	Relación entre el pico característico del anillo aromático del xilol a 1495 cm <sup>-1</sup> y la zona del espectro relativa a la deformación C=C del plano del anillo.
$\frac{\text{C} = \text{C} 1495}{= \text{CH Flex}}$	$\frac{1495}{820 \text{ a } 680}$	Relación entre el pico característico del anillo aromático del xilol a 1495 cm <sup>-1</sup> y la deformación fuera del plano del enlace =CH aromático.
$\frac{\text{C} = \text{C} 1495}{\text{Isom}}$	$\frac{1495}{2000 \text{ a } 1700}$	Relación entre el pico característico del anillo aromático del xilol a 1495 cm <sup>-1</sup> y las bandas de combinación características de los isómeros del xileno que se encuentran entre 2000 y 1700 cm <sup>-1</sup> .
$\frac{\text{Isom}}{= \text{CH Flex}}$	$\frac{2000 \text{ a } 1700}{820 \text{ a } 680}$	Relación entre y las bandas de combinación características de los isómeros del xileno que se encuentran entre 2000 y 1700 cm <sup>-1</sup> y la deformación fuera del plano del enlace =CH aromático.
$\frac{\text{Isom}}{\text{C} = \text{C} 1600}$	$\frac{2000 \text{ a } 1700}{1700 \text{ a } 1550}$	Relación entre y las bandas de combinación características de los isómeros del xileno que se encuentran entre 2000 y 1700 cm <sup>-1</sup> y la zona del espectro relativa a la deformación C=C del plano del anillo.
$\frac{= \text{CH Flex}}{\text{C} = \text{C} 1600}$	$\frac{820 \text{ a } 680}{1700 \text{ a } 1550}$	Relación entre la deformación fuera del plano del enlace =CH aromático y la zona del espectro relativa a la deformación C=C del plano del anillo.

### **2.3.8. Análisis de componentes principales (PCA)**

Para evaluar la efectividad de cada proceso, se realizó un análisis de componentes principales al grupo de muestras obtenidas y sus correspondientes variables en las cuales se incluyeron los cocientes de áreas descriptos previamente.

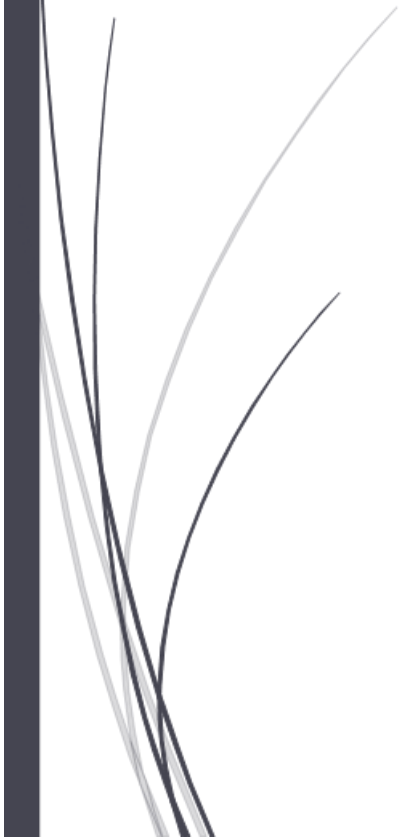
### **2.3.9. Análisis de la varianza (ANOVA)**

Por último se realiza un análisis de la varianza con un factor, para discriminar si los grupos que se desean contrastar resultan significativamente diferentes o no, con un 95% de confianza. Esto se logra mediante la observación del  $p$ -valor.



# CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## **CAPÍTULO III**

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con el fin de optimizar un método de purificación del solvente en estudio, se propusieron dos metodologías, las cuales fueron descritas previamente.

En primer lugar, se realizaron ensayos para establecer las condiciones óptimas de realización de pastillas de bromuro de potasio para poder obtener espectros de infrarrojos de cada una de las muestras a analizar. Los resultados espectrales de las muestras de solvente obtenidas luego de aplicar los respectivos métodos de purificación se evaluaron en comparación con los datos correspondientes al XC mediante la aplicación de PCA. Durante la realización del PCA, se reformularon las condiciones de dicho análisis en función de la eliminación de valores atípicos y de variables que resultaban prescindibles. Esto se logró mediante la aplicación de ciertos criterios que se exponen a continuación.

#### **3.1. ENSAYOS PRELIMINARES**

A lo largo de esta sección se dará explicación a los detalles técnicos de cada uno de los procedimientos experimentales, y se desarrollarán los criterios implementados para obtener el PCA. Esto engloba todas las muestras incorporadas en el análisis, y las variables informativas que permitieron la obtención del modelo expuesto en la sección de resultados.

##### **3.1.1. Selección del tiempo de centrifugación**

Se realizó un ensayo exploratorio sobre el tiempo a implementar durante la centrifugación de la MPH. Con este fin, se centrifugó a la velocidad de trabajo más elevada, 486 g, durante 10 minutos (superando esta velocidad se corre el riesgo de romper los tubos de vidrio) y a la velocidad más baja, 284 g, durante 15 minutos. Al notarse mayor turbidez en la fase a purificar en el primer caso, se determinó realizar los ensayos a un tiempo común de 15 minutos.

### 3.1.2. Condiciones de destilación

Se llevaron a cabo dos destilaciones, denominadas A y B. En ambas, a lo largo de la colecta de la fracción 0, cabeza de destilación, se mantuvo la temperatura constante a un valor de 74 °C durante algunos minutos. Posteriormente, se elevó a 130-132 °C, temperatura a la cual se desencadenó el resto de la destilación.

En la Tabla 3.1 se muestran las condiciones de recolección de cada una de las fracciones de la destilación A.

**Tabla 3.1.** Condiciones de destilación A

Fracción	Masa [g]	Volumen [mL]	Densidad [g/mL]	Temperatura [°C]	Tiempo [min]
<b>FDA0 (Cabeza)</b>	21,24	25	0,850	74	8 a 20
				130	21 a 38
<b>FDA1</b>	21,55	25	0,862	130	39 a 43
<b>FDA2</b>	21,60	25	0,864	130	44 a 49
<b>FDA3</b>	21,56	25	0,862	130 – 132	50 a 54
<b>CDA*</b>	21,83	25	0,873	-	-

\*El cálculo de densidad de la cola (CDA), se efectuó tomando 25 mL del volumen total, de aproximadamente 40mL, remanente en el balón.

Al finalizar la primera destilación, se notó la pérdida de un volumen de 10 mL en la cola para alcanzar el volumen total inicial. Revisando el equipo de destilación, se encontró que la unión entre la columna Vigreux y el tubo refrigerante presentaba una pequeña fisura por la cual escapó el volumen faltante de solvente. Al reparar en la causa del inconveniente, se logró restaurar el equipo de destilación y de esta manera, se pudo realizar una nueva destilación. Las condiciones de la destilación B se exponen en la Tabla 3.2.

La reparación del equipo de destilación resultó eficiente debido a que el volumen inicial colocado en el balón de destilación coincide con la sumatoria de los volúmenes obtenidos de cada una de las fracciones, y de la cola.

Como se puede ver en los cálculos de densidad, no se observan diferencias apreciables entre las distintas fracciones y la cola. Por lo tanto, este parámetro no puede ser tomado como indicador del proceso de purificación. Con mayor énfasis, el análisis por FT-IR es utilizado para llevar a cabo el seguimiento de la purificación.

**Tabla 3.2.** Condiciones de destilación B

Fracción	Masa [g]	Volumen [mL]	Densidad [g/mL]	Temperatura [°C]	Tiempo [min]
<b>FDB0 (Cabeza)</b>	21,31	25	0,853	74	8 a 16
				130-132	16 a 23
<b>FDB1</b>	21,58	25	0,863	130-132	24 a 43
<b>DFB2</b>	21,60	25	0,864	130-132	44 a 46
<b>FDB3</b>	21,59	25	0,864	130-132	47 a 50
<b>CDB*</b>	21,87	25	0,875	-	-

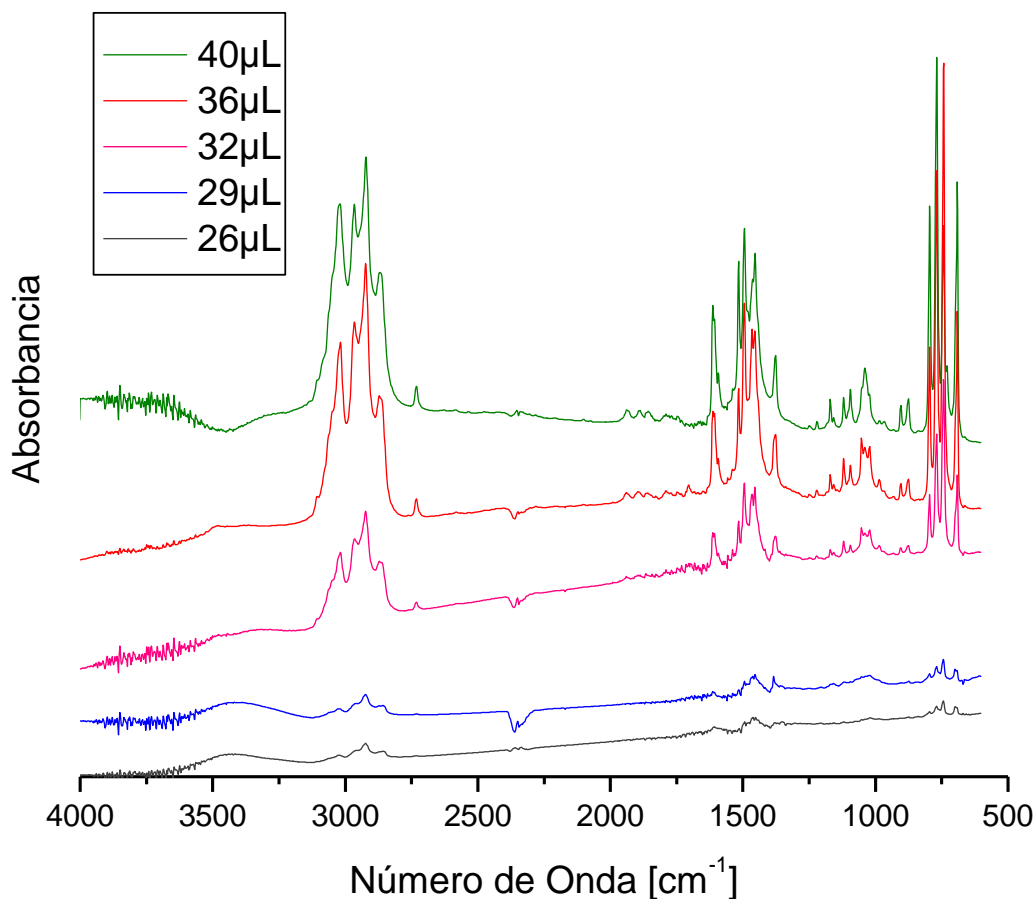
\*El cálculo de densidad de la cola (CDB), se efectuó tomando 25 mL del volumen total, de aproximadamente 50mL, remanente en el balón.

### 3.1.3. Optimización de condiciones de preparación de pastillas

Se planteó una alternativa a la preparación de muestras líquidas, denominada película líquida, sugerida por la bibliografía<sup>20,21</sup>. Para evaluar la efectividad de la técnica propuesta, se realizaron espectros FT-IR de prueba de pastillas que contenían volúmenes crecientes de xilol Comercial (XC). En la Figura 3.1 se puede observar que el espectro correspondiente al volumen de muestra menor, 26  $\mu$ L, posee la más baja relación señal/ruido (S/R) del grupo representado. Por el contrario, las pastillas de 36 y 40  $\mu$ L muestran una buena relación S/R, y permiten distinguir los picos característicos de la muestra, que se identificaron en la introducción.

El límite superior de volumen de prueba se estableció en 40  $\mu$ L. Bajo estas condiciones, el exceso de xilol que no se incorporó a la pastilla, se derramó del pastillero. Además, la pastilla se adhirió a la superficie del molde, complicando su extracción.

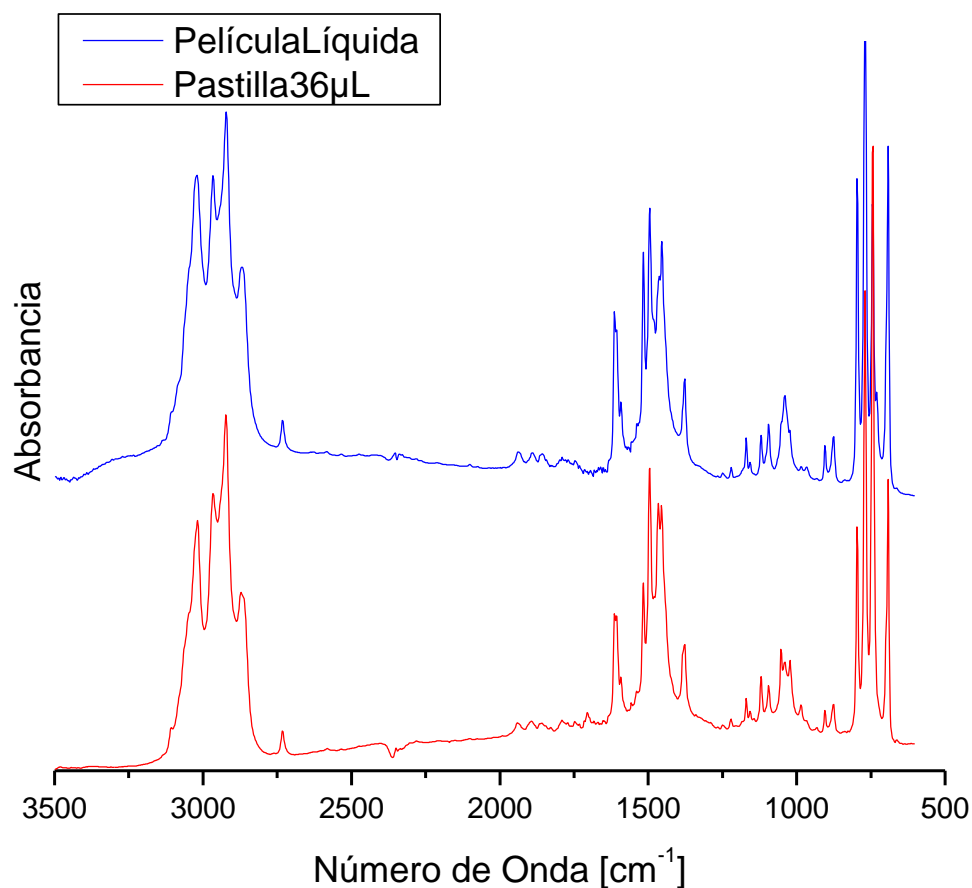
Consecuentemente, se fijó el volumen de trabajo en 36  $\mu$ L debido a que el espectro de esta muestra no presenta grandes diferencias respecto al de 40  $\mu$ L. Y al mismo tiempo, bajo dichas condiciones, no surgieron complicaciones operativas.



**Figura 3.1.** Espectros FT-IR de pastillas con volúmenes de prueba crecientes.

Por otra parte, en la Figura 3.2 se puede observar que, por medio de la técnica propuesta (con el agregado de 36  $\mu\text{L}$  de muestra), se obtienen espectros comparables a los que se logran mediante la realización del método de película líquida.

La técnica sugerida por la bibliografía requiere, para cada muestra, la preparación de dos pastillas de KBr, la obtención de un espectro blanco en conjunto de las mismas, y la manipulación de ambas junto con las muestras en cada etapa. En contrapartida, la técnica propuesta permite la preparación de una sola pastilla con la muestra en su interior, análogamente a lo que indica la bibliografía para el análisis de muestras sólidas<sup>21</sup>. Como consecuencia, la técnica desarrollada es comparable con técnicas estandarizadas, resulta más sencilla, y permite analizar mayor cantidad de muestras en menos tiempo.



**Figura 3.2.** Comparación entre espectros obtenidos por medio de la técnica de película líquida (bibliografía) y pastilla de 36  $\mu\text{L}$  (técnica propuesta).

### 3.1.4. Eliminación de valores atípicos y de variables no informativas por PCA

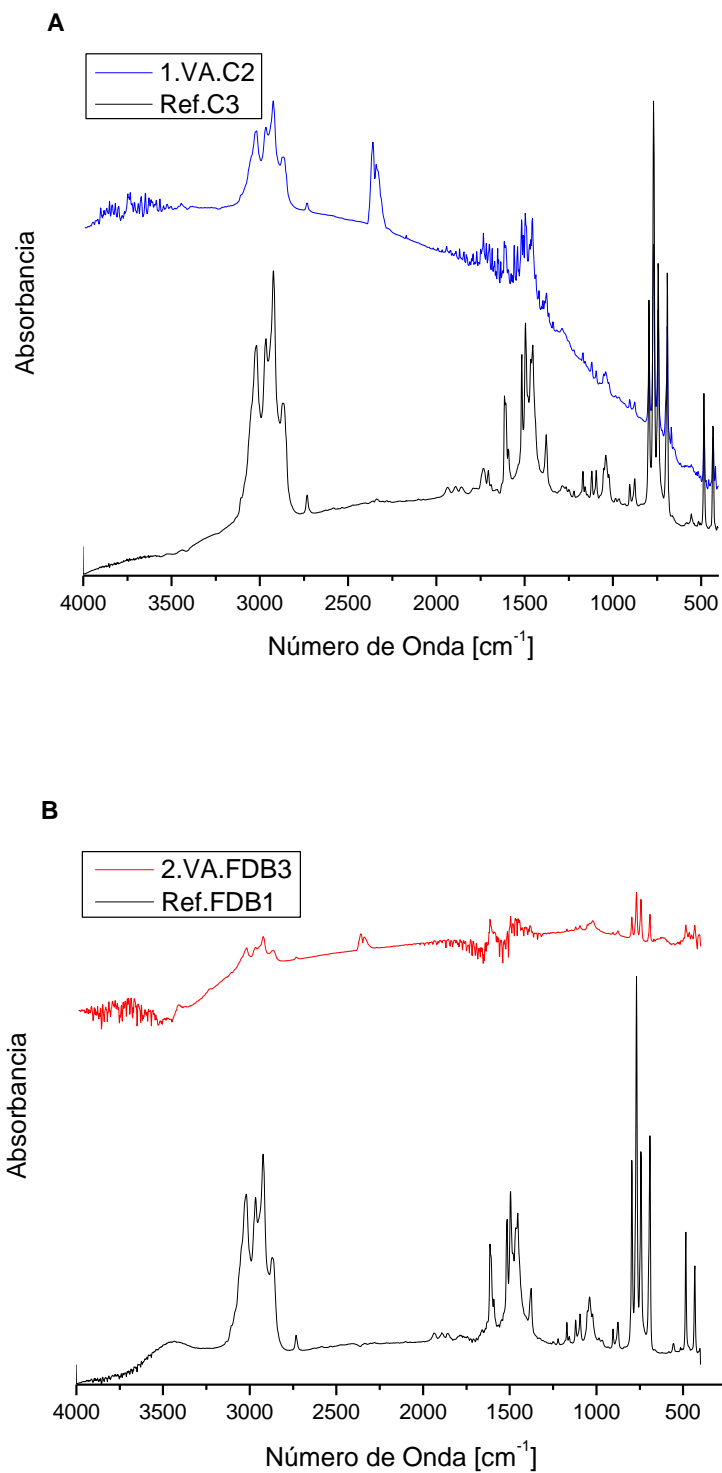
Es necesario hacer una selección previa de los elementos que constituyen el grupo definitivo de muestras para presentar los resultados, como así también, de las variables que determinan el análisis que mejor represente el conjunto de datos y sus características.

#### 3.1.4.1 Valores atípicos

Los valores atípicos son aquellas observaciones que se desvían significativamente del resto, y que provocan una mala representación de los grupos de muestras<sup>37</sup>. En consecuencia, para obtener una buena representación, es menester eliminarlos.







**Figura 3.4.** Espectros FT-IR de: **A** Valor atípico 1 (C2 Figura 3.3) en comparación con otro del mismo grupo de datos (C3) y **B** Valor atípico 2 (FDB3 Figura 3.3) en comparación con otro del mismo grupo de datos (FDB1).

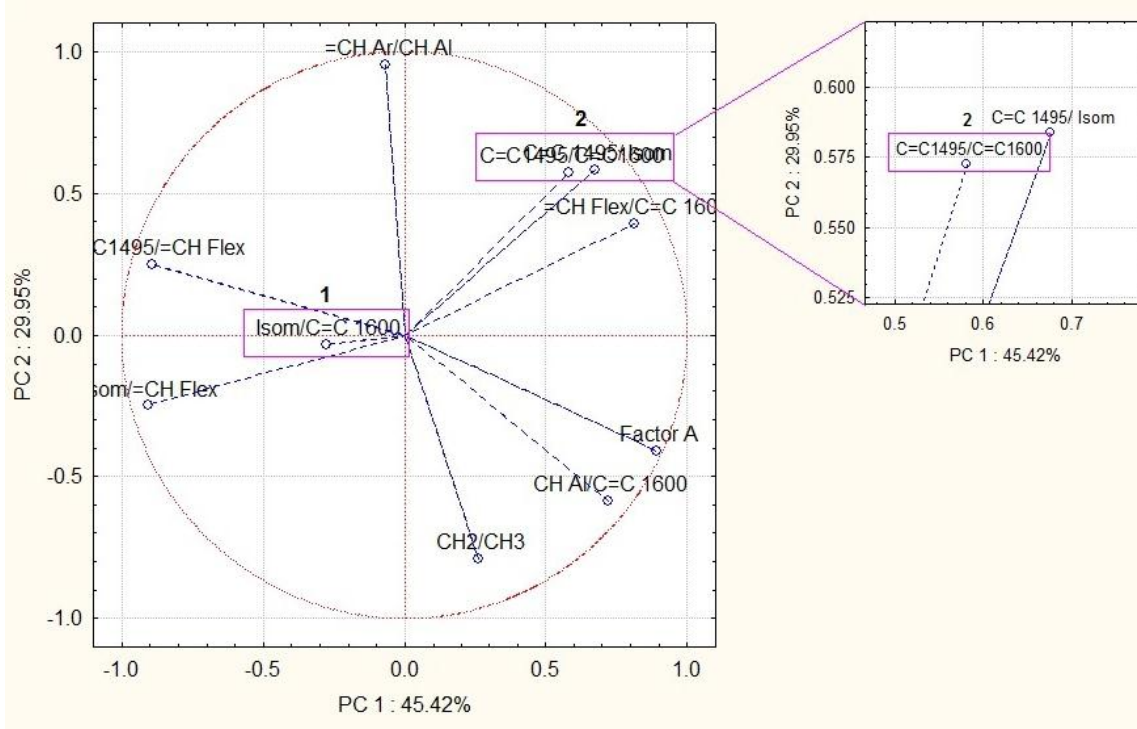
En la Figura 3.4 se muestran los espectros FT-IR correspondientes a los puntos 1 (C2) y 2 (FDB3) señalados en la Figura 3.3. En contraste con los espectros de referencia (C3 y FDB1, respectivamente), se advierte que los espectros correspondientes a los puntos aislados poseen una relación S/R baja, que la línea de base no tiende a ser constante, y que los picos correspondientes al CO<sub>2</sub> que se encuentran entre 2400 y 2300 cm<sup>-1</sup> no han sido bien corregidos con el espectro blanco, siendo más evidente en el valor atípico 1 (C2). En efecto, la extracción de datos de áreas de los picos correspondientes a los valores atípicos resulta pobre, por lo cual es natural encontrar que estos puntos se alejen de los grupos de datos a los cuales pertenecen.

Este criterio de eliminación de valores atípicos se aplicó a todas las muestras que no figuran en el PCA expuesto como resultado del análisis.

#### ***3.1.4.2. Variables no informativas***

La eliminación de variables no informativas en conjuntos de datos multivariantes, antes de realizar un modelado final, puede mejorar su capacidad predictiva<sup>38</sup>. En la Figura 3.5 se muestran todas las variables involucradas en el análisis, y se recuadran aquellas que se consideran no informativas (1 y 2). Esta selección se debe a que contribuyen escasamente a las componentes principales que explican el mayor porcentaje de la varianza, o a que su aporte es casi el mismo que el de otras variables. La variable Isom/C=C 1600, señalada como 1, contribuye escasamente a PC1 y a PC2 y. La variable C=C 1495/C=C 1600, señalada como 2, contribuye prácticamente de la misma manera que lo hace C=C 1495/Isom.

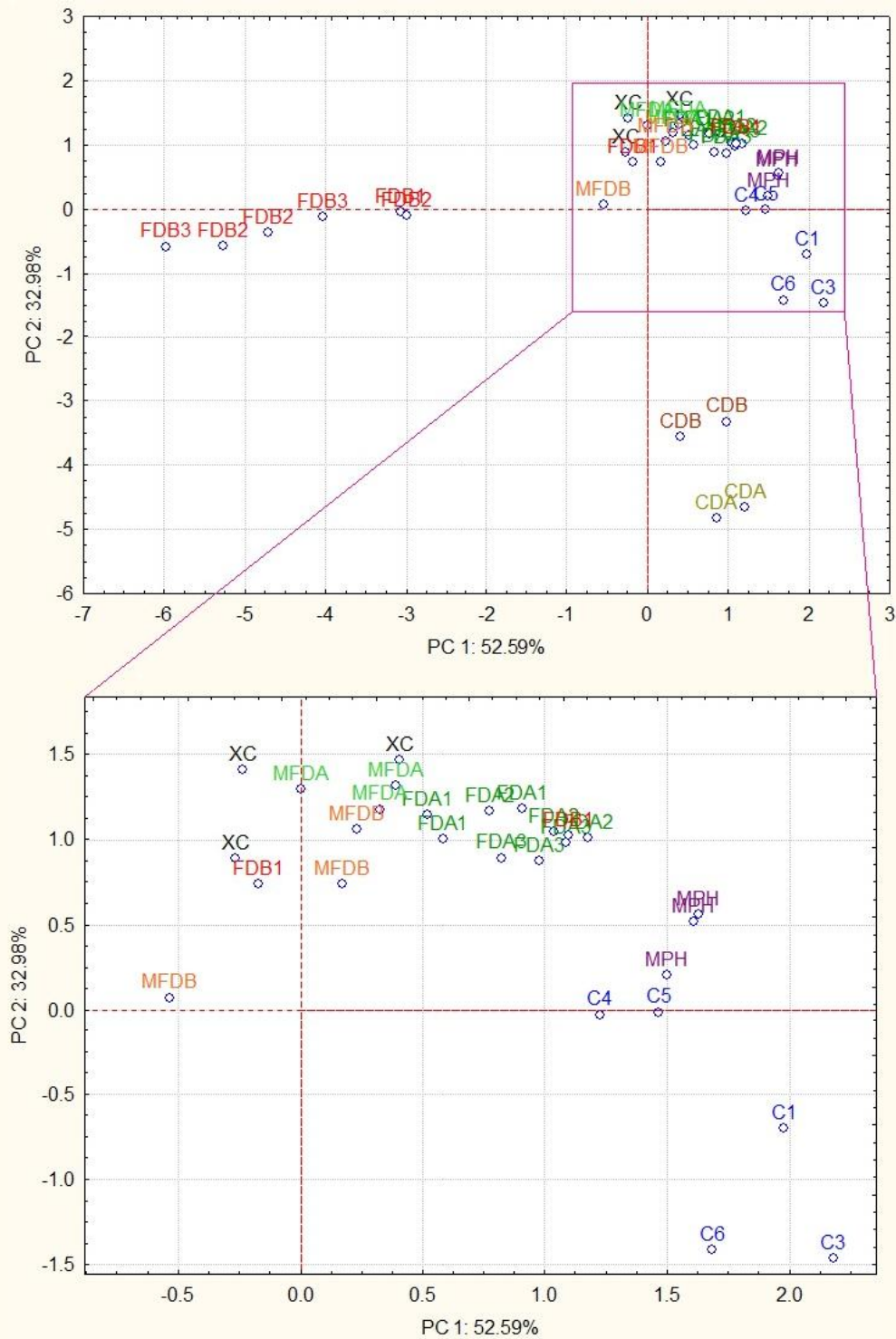
Este criterio de eliminación de variables fue aplicado a todos los análisis que se llevaron a cabo, y permitió explicar un mayor porcentaje de varianza de los datos para la misma cantidad de componentes principales seleccionadas. En la Figura 3.7 mostrada en la sección de resultados generales, se expone el nuevo conjunto de variables. Este avance, se obtuvo tras la eliminación de aquellas variables que fueron señaladas en la Figura 3.5.



**Figura 3.5.** Representación de todas las variables evaluadas, en función de PC1 y PC2 antes de la eliminación de las que fueron señaladas. **1** presenta un bajo aporte a PC1 y prácticamente nulo a PC2, y **2** contribuye casi del mismo modo que lo hace C=C 1495/Isom. Aclaración: el software utilizado posee formato de texto en inglés por lo cual las comas aparecen como puntos.

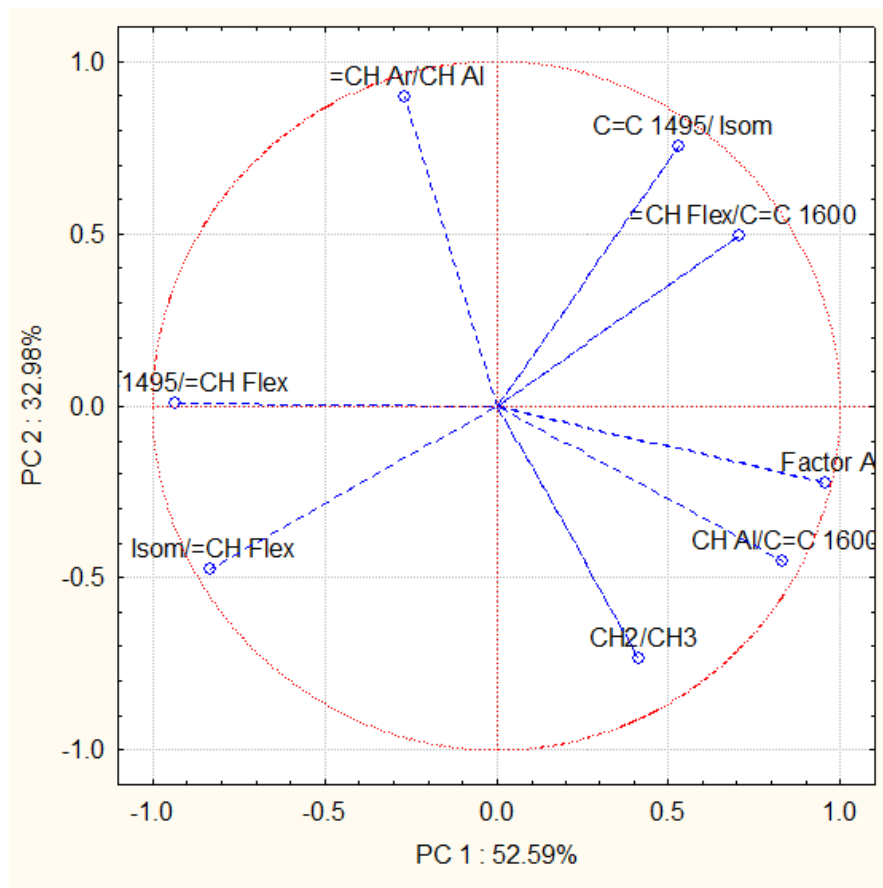
### 3.2 RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tras efectuar un PCA, con los valores atípicos y las variables no informativas eliminados. En la Figura 3.6 se muestran todos los grupos de muestras, y su distribución en el plano definido por las componentes principales 1 y 2. Además se amplía la zona recuadrada permitiendo identificar grupos de muestras que, a pesar de estar agrupadas, presentan importantes diferencias. La aglomeración de estos puntos se debe a que alrededor, se encuentran grupos de muestras con mayores diferencias respecto a las componentes principales establecidas, como FDB y CD, A y B.



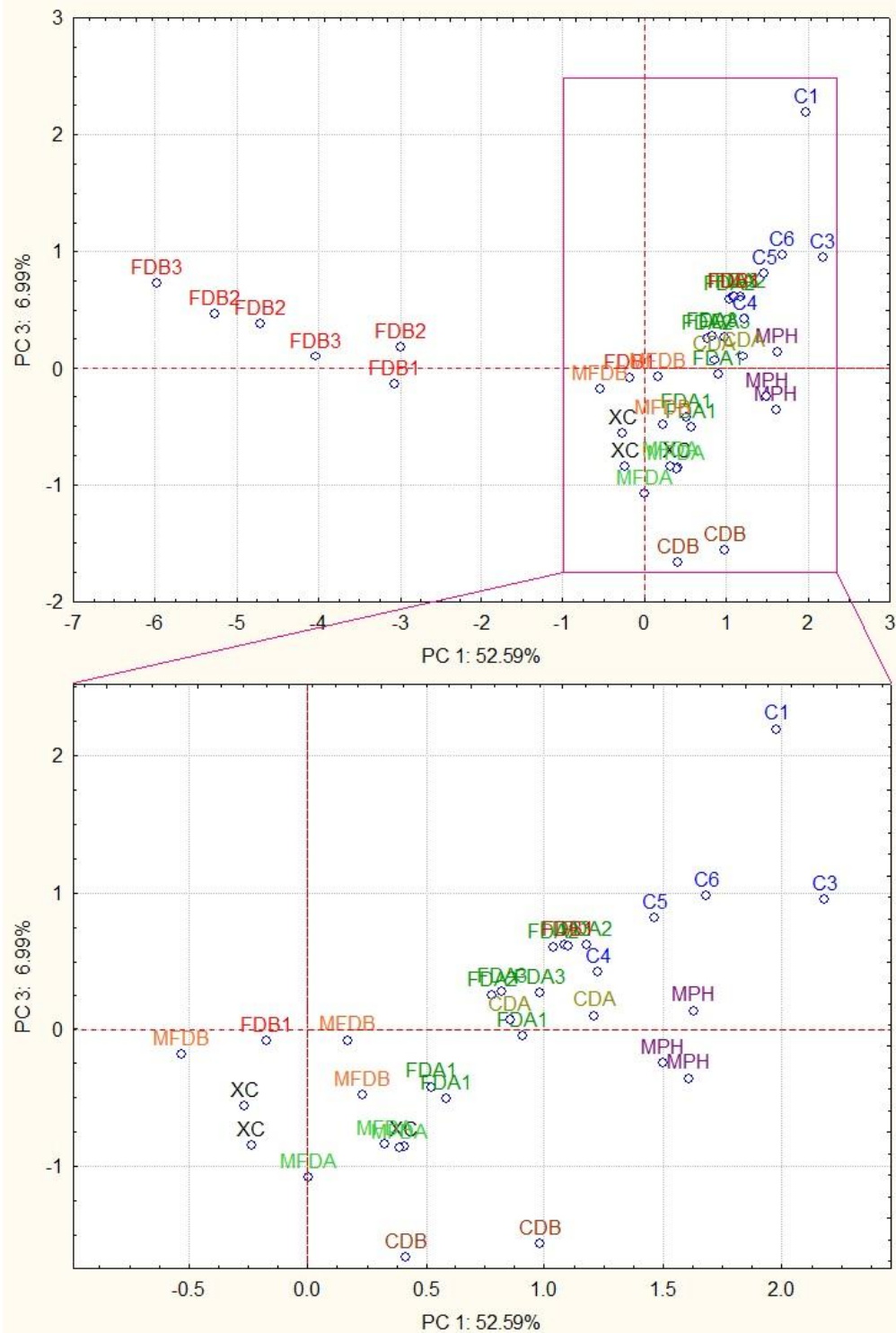
**Figura 3.6.** Representación de muestras en el plano definido por PC1 y PC2. Referencias: XC: xilol comercial (x3), MPH: muestra de partida de histología (x3), C1 a C6: centrifugaciones (x1), FDA1 a FDA 3: fracciones de destilación A (x3), CDA: colas de destilación A (x3), MFDA: mezcla de fracciones de destilación A (x3); FDB1 a FDB 3: fracciones de destilación B (x3), CDB: colas de destilación B (x3), MFDB: mezcla de fracciones de destilación B (x3). *Aclaración: el software utilizado posee formato de texto en inglés por lo cual, las comas aparecen como puntos.*

Por otra parte, la Figura 3.7 expone las variables puestas en juego en el PCA, y cuánto aporta cada una de ellas a PC1 y PC2. Se puede observar a simple vista que todas las variables contribuyen significativamente, y que el paso previo de eliminación de aquellas que no resultaban informativas, mejoró el análisis. Este progreso se ve reflejado en el mayor porcentaje de varianza de los datos, explicado por PC1 y PC2, respecto de aquellos que se observan en la Figura 3.5 de la sección precedente, donde aún no se eliminaban las variables resaltadas.



**Figura 3.7.** Representación de las variables en el plano definido por PC1 y PC2. Han sido eliminadas las variables no informativas señaladas en la Figura 3.5. *Aclaración: el software utilizado posee formato de texto en inglés por lo cual las comas aparecen como puntos.*

En la Figura 3.8 se grafican las muestras en función de PC 1 y PC3. Al incluir la componente principal 3 en el modelo se logra, en este caso, explicar el 92,56 % de la varianza de los datos (Tabla 3.2). Además, permite otorgarle tridimensionalidad a la distribución de los puntos que representan las muestras en el espacio definido por las PC 1, 2 y 3.

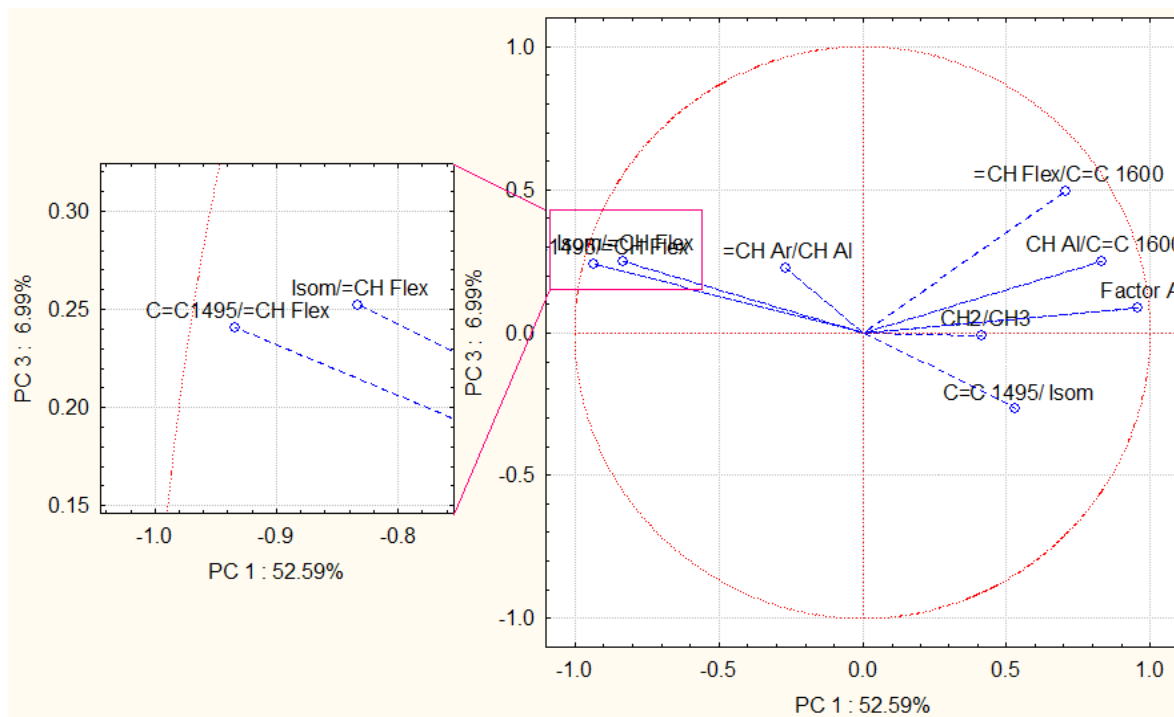


**Figura 3.8.** Representación de muestras en el plano definido por PC1 y PC3. Referencias: XC: xilol comercial (x3), MPH: muestra de partida de histología (x3), C1 a C6: centrifugaciones (x1), FDA1 a FDA 3: fracciones de destilación A (x3), CDA: colas de destilación A (x3), MFDA: mezcla de fracciones de destilación A (x3); FDB1 a FDB 3: fracciones de destilación B (x3), CDB: colas de destilación B (x3), MFDB: mezcla de fracciones de destilación B (x3). *Aclaración: el software utilizado posee formato de texto en inglés por lo cual, las comas aparecen como puntos.*

**Tabla 3.2.** Varianza explicada de componentes principales 1, 2 y 3.

Componente Principal	Varianza Explicada (%)	Varianza Explicada Acumulada (%)
1	52,59	52,59
2	32,98	85,57
3	6,99	92,56

En la Figura 3.9 se grafican las variables del PCA en función de PC1 y PC3. En ella se puede visualizar que ocurre una superposición entre dos variables, y que otras dos no aportan significativamente a PC3. Naturalmente esto puede ocurrir, debido a que las mismas variables que resultan significativas para PC1 y PC2 no tienen por qué serlo también para PC3. Sin embargo, es importante destacar que, como se observa en la Figura 3.10, el 85,57% de la varianza de los datos queda explicada tan sólo con PC1 y PC2.



**Figura 3.9.** Representación de las variables en el plano definido por PC1 y PC3. Aclaración: *el software utilizado posee formato de texto en inglés por lo cual, las comas aparecen como puntos.*

Finalmente, a lo largo de las siguientes secciones se discuten los resultados obtenidos, correspondientes a cada etapa experimental llevada a cabo.



### 3.2.1. Xilol comercial (XC) vs. muestra de partida de histología (MPH)

Estos dos grupos de muestras se tomaron como puntos de comparación para la evaluación de la efectividad de los procesos de purificación propuestos. El objetivo es obtener un solvente purificado, que posea características químicas comparables con las del solvente comercial XC, y que por lo tanto, se diferencie de la MPH que se desea purificar.

En el detalle del recuadro de la Figura 3.6 se puede observar que XC se localiza en la zona de mayor aporte de la variable  $\text{=CH Ar/CH Al}$  a PC2. Esta tendencia resulta coherente con las características químicas de las moléculas presentes en XC, debido a que se trata de una mezcla de isómeros del xileno, cuyo carácter aromático prevalece sobre el alifático.

Por otra parte, el grupo de MPH se localiza en la zona donde la variable  $\text{=CH Flex/C=C1600}$  aporta positivamente a PC1. Esta variable es un cociente de zonas espectrales características de los isómeros del xileno. Ya que la composición mayoritaria de MPH es xilol, resulta interesante encontrarla entre dicha variable, y el Factor A (cociente de mayor aporte positivo a PC1). Como se describió en la Tabla 2.2, el Factor A es un indicador de que mientras más cerca se encuentre de la región definida por esta variable, mayor carácter alifático poseerá la muestra en cuestión. Este resultado puede deberse a que la muestra se encuentra impurificada con MIT, el cual otorga esta característica.

En el caso de PC1 y PC3 (Figuras 3.8 y 3.9), MPH se encuentra asociada a las variables  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  y Factor A, que denotan mayor carácter alifático de la muestra con respecto a XC, debido a la presencia de MIT, reafirmando lo previamente expuesto.

XC y MPH forman dos conjuntos bien definidos, ubicados en las zonas de las variables que identifican los grupos funcionales presentes en cada uno de ellos. De acuerdo con los resultados del ANOVA de un factor, y con un 95% de confianza, los grupos XC y MPH resultan significativamente diferentes respecto a PC1, PC2 y PC3 (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** ANOVA de las PC 1, 2 y 3 para los grupos de muestras XC y MPH.

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
<b>XC</b>	3	-0,03174	0,37922	52,32074	0,00194	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>MPH</b>	3	1,57871	0,07002				
<b>PC2</b>							
<b>XC</b>	3	1,25366	0,31790	14,67910	0,01860	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>MPH</b>	3	0,42915	0,19462				
<b>PC3</b>							
<b>XC</b>	3	-0,7532	0,16528	11,17557	0,02876	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>MPH</b>	3	-0,1542	0,26268				

Sg.: Significativamente

### 3.2.2. Centrifugación

Las muestras centrifugadas (centrifugaciones “C” en la Fig. 3.6), independientemente de las condiciones experimentales, no son significativamente diferentes a MPH con respecto a PC1 (Tabla 3.4; 95% de confianza). Respecto a PC2 y PC3, MPH y C son significativamente diferentes. Debido a que PC1 es la componente que explica mayor porcentaje de varianza de los datos (52,59%), se concluye que la centrifugación no cumple con el objetivo de purificar el xilol.

**Tabla 3.4.** ANOVA de las PC 1, 2 y 3 para los grupos de muestras MPH y C.

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
<b>MPH</b>	3	1,57871	0,07002	0,31040	0,59759	0,05	No Sg. Diferentes
<b>C</b>	5	1,70683	0,38247				
<b>PC2</b>							
<b>MPH</b>	3	0,42915	0,19462	7,15328	0,03680	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>C</b>	5	-0,72319	0,70934				
<b>PC3</b>							
<b>MPH</b>	3	-0,15420	0,26268	8,94295	0,02431	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>C</b>	5	1,07247	0,66236				

Sg.: Significativamente

Por otra parte, se observa una tendencia de las muestras de centrifugación a diferenciarse de MPH en relación a PC2 y PC3.

A continuación se analizarán las contribuciones de cada una de las variables experimentales propuestas: presencia de NaCl y velocidad de centrifugación, para comprender la causa de dicha diferenciación.

### 3.2.2.1. Presencia de NaCl

A pesar de que para PC3, MPH y C con NaCl (C4, C5 y C6) son significativamente distintos (95% de confianza, Tabla 3.5), se concluye que el agregado de NaCl no muestra un efecto significativo en la purificación. Esto se explica, por el hecho de que C con NaCl no forma un grupo significativamente distinto al de MPH para las PC1 y PC2, las cuales, en conjunto, explican el 85,57% de la varianza de los datos.

**Tabla 3.5.** ANOVA de PC 1, 2 y 3. Grupos de muestras MPH y C con NaCl (C4, C5 y C6).

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
MPH	3	1,57871	0,07002	0,75363	0,43431	0,05	No Sg. Diferentes
C con NaCl	3	1,45903	0,22828				
<b>PC2</b>							
MPH	3	0,42915	0,19462	3,65363	0,12853	0,05	No Sg. Diferentes
C con NaCl	3	-0,48497	0,80514				
<b>PC3</b>							
MPH	3	-0,15420	0,26268	16,08669	0,01599	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
C con NaCl	3	0,73950	0,28276				

Sg.: Significativamente.

### 3.2.2.2 Velocidad de centrifugación

Se efectuó un ANOVA de un factor a los datos de las centrifugaciones llevadas a cabo a 486 g (C3 y C6), y se los comparó con el grupo MPH, para evaluar el efecto del aumento de la velocidad de centrifugación. Con un 95% de confianza, para PC1, los grupos no resultaron significativamente diferentes (Tabla 3.6). Sin embargo, para PC2 y PC3, MPH y C a 486 g, son significativamente diferentes.

C3 (486 g, sin NaCl) y C6 (486 g, con NaCl) se encuentran alejados de la zona donde se ubica MPH. En efecto, se posicionan alrededor de las variables que indican mayor carácter alifático, como Factor A y CH Al/C=C 1600 (Figuras 3.6 y 3.7). Ambas variables, contribuyen negativamente a PC2. Este comportamiento, podría deberse a que, a mayor

velocidad de centrifugación (independientemente de la presencia de sal), se favorecería la separación de la fase polar de la fase orgánica, concentrando aún más el MIT en esta última, en el cual es soluble.

**Tabla 3.6.** ANOVA de PC 1, 2 y 3. Grupos de muestras MPH y C a 486 g (C3 y C6).

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
MPH	3	1,57871	0,07002	3,38124	0,16323	0,05	No Sg. Diferentes
C a 486 g	2	1,93167	0,35048				
<b>PC2</b>							
MPH	3	0,42915	0,19462	163,32069	0,00103	0,05	Sg. Diferentes
C a 486 g	2	-1,43814	0,03325				
<b>PC3</b>							
MPH	3	-0,15420	0,26268	32,61028	0,01065	0,05	Sg. Diferentes
C a 486 g	2	0,96478	0,01518				

Sg.: Significativamente.

A nivel experimental, la centrifugación puede ser útil para separar la fase acuosa, compuesta de agua y etanol, de la fase orgánica. Sin embargo, no resulta eficiente para separar el MIT de los xilenos. Por ende, esta técnica no encuentra aplicación como herramienta para alcanzar el objetivo del presente trabajo.

### 3.2.3. Destilación

A simple vista, en las Figuras 3.6 y 3.8, puede notarse que las muestras correspondientes a las fracciones de la destilación A (FDA) se agrupan uniformemente en las cercanías de XC. En cambio, las muestras de las fracciones de la destilación B (FDB), se diferencian de dichos grupos de muestras, ubicándose en la zona de mayor contribución de la variable C=C 1495/=CH Flex e Isom/=CH Flex al extremo negativo de PC1. Ambas variables son indicadoras de isomería. Este resultado podría deberse a que, durante el desarrollo de B (luego de reparar la fisura), se logra efectuar una destilación más eficiente, sin pérdida de muestra. Como consecuencia, la variación en la proporción de isómeros del xileno en cada una de las fracciones, a lo largo de la destilación B, resulta asequible.

Lo interesante de lo expuesto, es que mediante la realización de un análisis por FT-IR no sólo se consiguen identificar grupos funcionales de una muestra en particular. También es posible distinguir cambios en las condiciones experimentales, correlacionarlos con resultados estadísticos, y consecuentemente determinar las características químicas de diversos grupos de muestras.

### 3.2.3.1. Colas de destilación

El resultado del ANOVA efectuado a las PC de las colas de destilación, mostrado en la Tabla 3.7, permite distinguir que para PC1 y PC2 las colas de ambas destilaciones son significativamente diferentes a MPH. Sin embargo, para PC3, CDA no resulta significativamente diferente a MPH, aunque CDB si lo sea.

**Tabla 3.7.** ANOVA de PC 1, 2 y 3. Grupos de muestras MPH y CD (A y B).

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
MPH	3	1,57871	0,07002	14,69266	0,03129	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
CDA	2	1,03431	0,25062				
MPH	3	1,57871	0,07002	16,21832	0,02752	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
CDB	2	0,69783	0,40303				
<b>PC2</b>							
MPH	3	0,42915	0,19462	1063,38197	6,33824E-5	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
CDA	2	-4,74712	0,12230				
MPH	3	0,42915	0,19462	517,02974	1,86287E-4	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
CDB	2	-3,44000	0,16919				
<b>PC3</b>							
MPH	3	-0,15420	0,26268	1,56094	0,30013	0,05	No Sg. Diferentes
CDA	2	0,09086	0,02260				
MPH	3	-0,15420	0,26268	53,36638	0,00530	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
CDB	2	-1,61046	0,07113				

**Sg.:** Significativamente.

Por una parte, en la Figura 3.6 se puede ver que las colas de ambas destilaciones (CDA y CDB), presentan mayor carácter alifático respecto a la MPH debido a que se posicionan en la zona de la variable  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  (Figura 3.7). Esto es consistente con el hecho de que, al evaporarse los xilenos, la cola se concentra en MIT, generando una mayor relación S/R en la región del espectro donde se registra la señal de absorción de radiación

infrarroja de los enlaces C-H alifáticos. Además, esta relación sugiere algunas de las características químicas que presentan las moléculas que componen MIT, es decir, cadenas hidrocarbonadas largas y poco ramificadas.

Por otra parte, se puede advertir que en la Figura 3.8 (PC1 vs. PC3), las colas de la destilación B se separan de las de la destilación A, ubicándose en la zona donde se encuentra la variable C=C 1495/Isom. Este cociente es un indicador de la presencia, en CDB, de proporciones distintas de isómeros del xileno. Además, CDA se agrupa con MPH (Figura 3.8) en la zona donde se ubican las variables con mayor carácter alifático ( $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  y Factor A), dificultando que puedan diferenciarse como grupos significativamente distintos (Tabla 3.7).

### **3.2.3.2. Fracciones de destilación**

Como se mencionó previamente, las fracciones de destilación B se separaron de las obtenidas por medio de la destilación A. Sin embargo, las alícuotas de FDB1, se encuentran más cerca de XC, alejándose del grupo compuesto por FDB 2 y 3 (Figura 3.6 y 3.8).

Resulta oportuno recordar, que los puntos de ebullición de meta- y para-xileno difieren en tan sólo 1 °C, que el isómero orto-xileno presenta su punto de ebullición 4 °C por encima de los dos anteriores, y que en el XC, el isómero meta- se encuentra en mayor proporción (entre 60% y 70%) y el para- en menor proporción (< 5%)<sup>1</sup>. Las características de XC podrían explicar la distribución de las alícuotas de FDB1. Es decir, como meta-xileno se encuentra en mayor proporción en XC, y junto con para-xileno (menor proporción), poseen los puntos de ebullición más bajos de la tríada de isómeros, podría esperarse que FDB1 también posea mayor proporción de meta-xileno respecto a FDB 2 y 3. De este modo, presentaría características químicas semejantes al XC, y a las FDA, las cuales pueden no haberse diferenciado en distintas proporciones de xilenos, debido a que el equipo de destilación no funcionaba correctamente.

Por lo antes expuesto, para realizar el ANOVA a las PC de las fracciones de destilación, se considera necesario separar el grupo de datos FDB en dos subgrupos: FDB1, y FDB 2 y 3. En la Tabla 3.8, se muestran los resultados obtenidos de dicho análisis.

**Tabla 3.8.** ANOVA de PC 1, 2 y 3. Grupos de muestras XC, FDA, FDB1, y FDB 2 y 3.

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
<b>XC</b>	3	-0,03174	0,37922	27,04426	4.01059E-4	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>FDA</b>	9	0,87731	0,22358				
<b>XC</b>	3	-0,03174	0,37922	0,29646	0,61504	0,05	No Sg. Diferentes
<b>FDB 1</b>	3	-0,71300	2,13372				
<b>XC</b>	3	-0,03174	0,37922	42,55789	6,1909E-4	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>FDB 2 y 3</b>	5	-4,59577	1,14223				
<b>PC2</b>							
<b>XC</b>	3	1,25366	0,31790	3,57914	0,08779	0,05	No Sg. Diferentes
<b>FDA</b>	9	1,03374	0,11287				
<b>XC</b>	3	1,25366	0,31790	3,40836	0,13860	0,05	No Sg. Diferentes
<b>FDB 1</b>	3	0,57144	0,55552				
<b>XC</b>	3	1,25366	0,31790	69,85421	1,59473E-4	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>FDB 2 y 3</b>	5	-0,34774	0,22961				
<b>PC3</b>							
<b>XC</b>	3	-0,75320	0,16528	12,92258	0,00489	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>FDA</b>	9	0,18391	0,42930				
<b>XC</b>	3	-0,75320	0,16528	11,38156	0,02795	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>FDB 1</b>	3	0,12959	0,42202				
<b>XC</b>	3	-0,75320	0,16528	47,43389	4,62431E-4	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
<b>FDB 2 y 3</b>	5	0,37654	0,24903				

Sg.: Significativamente.

Se obtuvo que, con un 95% de confianza, FDA es significativamente diferente a XC para PC1 y PC3, sin embargo no lo es para PC2. El agrupamiento de FDA con XC, se ubica en la zona de mayor contribución positiva a PC2 de las variables C=C 1495/Isom y =CH Flex /C=C 1600, ambas características de las moléculas de xileno.

Respecto a PC1 y PC2, se encontró que FDB1 y XC no son significativamente diferentes (95% de confianza), y que si lo son respecto a PC3. Nuevamente, esto se traduce en la mayor proporción de meta-xileno que pudiera existir en ambos grupos de muestras.

Finalmente, FDB2 y FDB3 son significativamente diferentes a XC con un 95% de confianza, respecto a las tres componentes principales PC1, PC2 y PC3.

### 3.2.3.3. Mezcla de fracciones de destilación

Con un 95% de confianza, los resultados de ANOVA de un factor mostraron que tanto MFDA como MFDB no son significativamente diferentes a XC para PC1 y PC2. Respecto a PC3, MFDB es significativamente diferente a XC, pero MFDA no lo es.

**Tabla 3.9.** ANOVA de PC 1, 2 y 3. Grupos de muestras XC, MFDA y MFDB.

Grupo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	F	p	$\alpha$	Decisión del análisis
<b>PC1</b>							
XC	3	-0,03174	0,37922	1,17479	0,33938	0,05	No Sg. Diferentes
MFDA	3	0,23836	0,20615				
XC	3	-0,03174	0,37922	0,00142	0,97174	0,05	No Sg. Diferentes
MFDB	3	-0,04413	0,42406				
<b>PC2</b>							
XC	3	1,25366	0,31790	0,00342	0,95614	0,05	No Sg. Diferentes
MFDA	3	1,26470	0,07598				
XC	3	1,25366	0,31790	3,34275	0,14150	0,05	No Sg. Diferentes
MFDB	3	0,62454	0,50413				
<b>PC3</b>							
XC	3	-0,7532	0,16528	2,04253	0,22616	0,05	No Sg. Diferentes
MFDA	3	-0,92637	0,12935				
XC	3	-0,75320	0,16528	10,79640	0,03034	0,05	<b>Sg. Diferentes</b>
MFDB	3	-0,24951	0,20779				

Sg.: Significativamente.

En el plano definido por PC1-PC2 (Figuras 3.6 y 3.7), las MFD de ambas destilaciones A y B, se agrupan con XC en la región de mayor aporte de la variable C=C 1495/Isom, característica de los xilenos presentes. Este resultado, es independiente de las características de las fracciones obtenidas en cada una de las destilaciones. Esto es un indicador de que efectivamente, como lo indica la bibliografía, la destilación es una técnica adecuada para obtener xilol purificado<sup>2,16-19</sup>, y que el XC es una mezcla de isómeros del xileno<sup>1</sup>.





# CAPÍTULO IV

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS



## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

#### 4.1. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, en relación al objetivo planteado, puede concluirse que:

- El xilol puede purificarse por medio de una destilación fraccionada, obteniendo como producto final un reactivo comparable al xilol comercial.
- El empleo de la espectrometría FT-IR combinado con análisis estadísticos multivariados durante el seguimiento del proceso de purificación permitió corroborar la efectividad del mismo, y controlar la calidad del producto final.
- La técnica de preparación de muestra líquida para análisis por FT-IR, propuesta como una variación de la que se utiliza comúnmente para muestras líquidas, resulta reproducible. Esto se debe, a que los conjuntos de datos analizados, obtenidos mediante las pastillas con 36  $\mu\text{L}$  de muestra, son comparables entre sí, y con los obtenidos mediante la película líquida (técnica sugerida por la bibliografía). La técnica propuesta en este trabajo, resulta más rápida y sencilla, permitiendo obtener espectros con una buena relación S/R.
- La centrifugación permite la separación de las fases acuosa y orgánica de la MPH. Sin embargo, no es posible separar el xilol respecto del medio de inclusión de tejidos mediante esta metodología.
- En base a las fracciones colectadas en cada etapa del proceso, puede estimarse que el porcentaje de purificación del solvente oscila entre 50 y 70%. Estos valores dependen de las características que presente la muestra de partida de histología.
- La puesta en práctica de esta propuesta de química verde, permite generar un impacto positivo en la sociedad, encontrando como fin último una gran aplicabilidad y un alto nivel de transferencia.

## 4.2. Perspectivas futuras

A pesar de que la centrifugación no resultara adecuada para efectuar la purificación del xilol, una velocidad de centrifugación de 486 g, mejoró la separación de las fases acuosa y orgánica. Para evaluar el grado de purificación del xilol respecto a la fase acuosa, podría realizarse una valoración de trazas de agua por el método de Karl-Fischer a muestras a las que se les aplique velocidades de centrifugación elevadas.

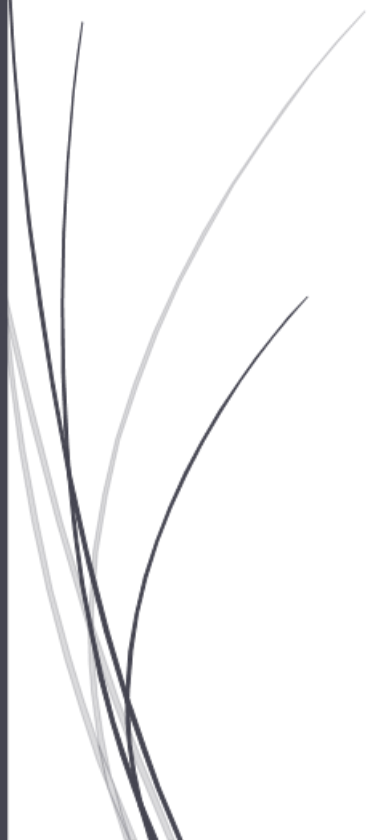
Debido a que se encontró que las fracciones de destilación pueden presentar distintas proporciones de los isómeros del xileno, podrían estudiarse con mayor profundidad las características que presentan cada una de ellas, las cuales las diferencian del resto.

Podría estudiarse la metodología propuesta a mayor escala, para determinar si se mantiene el proceso descrito, pudiendo tratar mayor cantidad de desechos en menor tiempo.



# CAPÍTULO V

## BIBLIOGRAFÍA



## CAPÍTULO V

### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Mager Stellman, J., Osinsky, D. & Markkanen, P. Guía de productos químicos. Hidrocarburos Aromáticos. *ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO. Vol 4* 282–295 (2001).
2. Gibbs, L. M. Recovery of waste organic solvents in a health care institution. *Clin. Prod. Rev.* 37–43 (1983).
3. Occupational Safety and Health Administration (OSHA). OSHA Occupational Chemical Database. (2017).
4. Límites Exposición Profesional, D. DOCUMENTACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL LÍMITE DE EXPOSICIÓN PROFESIONAL DE LOS ISÓMEROS DE XILENOS. 6 (2011).
5. Wade, L. G., Pedrero, Á. M. M. & García, C. B. *Química orgánica*. (Pearson Educación, 2004).
6. Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*. (Reverte, 2006).
7. Montagud, A. H. & Alonso Espadalé, R. M. NTP 663: Propiedades fisicoquímicas relevantes en la prevención del riesgo químico. 8 (2000).
8. Gibson, C. S. *Essential Principles of Organic Chemistry*. (Cambridge University Press, 2016).
9. Weissermel, K. & Arpe, H.-J. *Química orgánica industrial*. (Reverte, 1981). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
10. Beyer, M. L. . . . [et al. ] & Walter, W. Manual de química orgánica. *Manual de química orgánica* 463, 681 (1987).
11. Wypych, G. *Handbook of Solvents*. (ChemTec, 2001). doi:10.1016/B978-1-895198-65-2.50010-7
12. Fieser, L. & Fieser, M. *Química orgánica fundamental*. (Reverte, 1985).
13. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. (Panamericana, 2012).

14. Poder Ejecutivo Nacional de la Republica Argentina. *Decreto 974/16*. 7 (RENPRE, 2016).
15. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación, A. Químicos prohibidos y restringidos en Argentina. 31 (2013).
16. Miller, M. J. *et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Morbidity and Mortality Weekly Report*. **6**, (2012).
17. Ronda, R. *Reducing Chemical Waste through Distillation*. (2013).
18. Huang, C.-S. & Ciesla, J. J. Lessons learned from the on-site distillation of used solvents generated by health care facilities. *J. Environ. Health* **55**, 26–30 (1992).
19. Grushka, M. J. & Spark, R. P. Recycling xylene saves money and the environment. *Med. Lab. Obs.* **23**, 55–60 (1991).
20. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. (Mc Graw Hill, 2001).
21. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. (Wiley, 2004).
22. Colthup, N. B., Daly, L. H. & Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. (Academic Press, 1964).
23. Linstrom, P. J. & Mallard, W. G. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. *National Institute of Standards and Technology* (2016). Available at: <http://webbook.nist.gov/>.
24. Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H. & Cameron, D. G. Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands. *Appl. Spectrosc.* **35**, 271–276 (1981).
25. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M. & Buydens, L. M. C. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. (Elsevier Science, 1997).
26. Varmuza, K. & Filzmoser, P. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*. (CRC Press, 2016).
27. Beebe, K., Pell, R. & Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A Practical Guide*. (Wiley, 1998).

28. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. (Pearson/Prentice Hall, 2005).
29. Mongay Fernandez, C. *Quimiometría*. (2005).
30. Miller, R. G. *Beyond ANOVA: Basics of Applied Statistics*. (Taylor & Francis, 1997).
31. Department of Health and Human Services, U. S. Center for Devices and Radiological Health (CDRH). (2017). Available at: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDRH/>.
32. Perkin Elmer, I. *User's Guide Spectrum BX*. (2000).
33. Lin, R. & Ritz, G. P. Reflectance FT-IR Microspectroscopy of Fossil Algae Contained in Organic-Rich Shales. *Appl. Spectrosc.* **47**, 265–271 (1993).
34. Lin, R. & Ritz, G. P. Studying individual macerals using i.r. microspectrometry, and implications on oil versus gas/condensate proneness and 'low-rank' generation. *Org. Geochem.* **20**, 695–706 (1993).
35. Guo, Y. & Bustin, R. M. Micro-FTIR spectroscopy of liptinite macerals in coal. *Int. J. Coal Geol.* **36**, 259–275 (1998).
36. Ganz, H. & Kalkreuth, W. Application of infrared spectroscopy to the classification of kerogen types and the evaluation of source rock and oil shale potentials. *Fuel* **66**, 708–711 (1987).
37. Hawkins, D. *Identification of Outliers*. (Springer Science & Business Media, 2013).
38. Centner, V. *et al.* Elimination of Uninformative Variables for Multivariate Calibration. *Anal. Chem.* **68**, 3851–3858 (1996).