

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



MEMORIA TÉCNICA

**“APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA DE GASES EN LA DETERMINACIÓN
DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS”**

TUTOR : Msc. Lic. WILSON CORI MAMANI

POSTULANTE: T.U.S. CORINA GUTIERREZ VILLALOBOS

LA PAZ – BOLIVIA

2014

A mí hijo.

A mis padres.

No ha sido fácil, pero hubiera sido aún más difícil sin todas aquellas personas que han estado a mi lado en algún momento en la elaboración de esta Memoria Técnica, y las quiero agradecer, porque de alguna manera u otra, me han ayudado a seguir.

Agradesco al Lic. Wilson Corí, Lic. Edmundo Ovando, Dr. Augusto Vargas y al Ing. Alvaro García por su apoyo y consejos a través de la realización de este estudio.

También quiero agradecer a todos los miembros de la Carrera de Química Industrial y la Facultad de Tecnología por depositar su confianza en mi persona.

Y por último, gracias a mi familia.

RESUMEN

Las bebidas alcohólicas pueden estar contaminadas con metanol, debido a que no son sometidas a procesos de destilación, en los cuales son purificadas al eliminarse la contaminación de ese tipo; ésta probabilidad aumenta cuando estas bebidas son elaboradas sin tomar en cuenta las buenas prácticas de manufactura y son distribuidas sin haberseles realizado un control de calidad riguroso, en el cual, pueda determinarse la presencia o no de contaminación.

Para el análisis de metanol es utilizada la cromatografía de gases que es una técnica muy utilizada por su gran capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles, como el metanol presente en las bebidas alcohólicas.

La investigación se llevó a cabo, con el fin de establecer las condiciones de trabajo en el equipo de cromatografía de gases de marca Shimadzu para determinar y cuantificar la presencia de metanol, con características toxicológicas mayores que el etanol, ya que no es eliminado fácilmente del organismo y puede provocar desde una embriaguez similar a la causada por el etanol, hasta ceguera o la muerte, según sea la cantidad ingerida. En los casos leves, el tratamiento consiste en la administración de etanol puro, para facilitar la eliminación del metanol, mientras que en casos graves es necesaria la diálisis con resultados poco favorables.

Para la cuantificación de metanol se verificó la similitud del tiempo de retención del estándar con los tiempos de retención mostrados por las muestras, relacionándolas luego las áreas de dicho tiempo de retención del estándar con la de cada muestra, para encontrar la concentración de metanol en cada una de las muestras mediante el método de estándar externo.

ÍNDICE

CAPITULO I	Pag
1. Introducción	1
1.2. Antecedentes	2
1.3. Justificación	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1 Ojetivo general	4
1.4.2. Objetivos específicos	4
 CAPÍTULO II	
2.1. Bebidas alcohólicas	6
2.2. Tipos de bebidas alcohólicas	6
2.3. Toxicología del metanol	7
2.3.1. Metanol	7
2.3.2. Metanol como contaminante en bebidas alcohólicas	7
2.3.3. Intoxicación por metanol	7
2.3.3.1. Intoxicación aguda	9
2.3.3.2. Intoxicación crónica	10
2.3.4. Anatomía patológica	10
2.3.4.1. Diagnóstico	11
2.3.4.2. Tratamiento	11
2.4. El metanol y otros componentes de las bebidas alcohólicas	12
2.4.1. Etanol	13
2.4.2. Metanol	13
2.4.3. Alcoholes superiores	13
2.4.4. Ácidos orgánicos	14
2.4.5. Ésteres	14
2.4.6. Aldéhdidos	14
2.5. Límites de los componentes en las bebidas alcohólicas	14
2.6. Cromatografía	16
2.6.1. Tipos de cromatografía	16
2.7. Cromatografía de gases.....	17
2.7.1. Descripción del equipo	18
2.7.1.1. Sistemas de introducción de muestras	21
2.7.1.1.1. Inyectores para columnas empaquetadas	21
2.7.1.1.2. Inyectores para columnas capilares	23
2.7.1.2. Columna cromatográfica	30
2.7.1.2.1. Columnas empaquetadas	32
2.7.1.2.2. Columnas tubulares abiertas	33

2.7.1.2.3. Soporte sólido	34
2.7.1.2.4. Fase estacionaria	36
2.7.1.2.5. Caracterización de las fases estacionarias	38
2.7.1.2.6. Características de alguna fases estacionarias	41
2.7.1.2.7. Elección de la columna	46
2.7.1.3. Detectores	48
2.7.1.3.1. Parámetros característicos de un detector	49
2.7.1.3.2. Tipos de detectores	52
2.7.1.3.2.1. Detector de conductividad térmica	53
2.7.1.3.2.2. Detector de ionización de llama (FID).....	54
2.7.1.3.2.3. Detector de captura electrónica	55
2.7.1.3.2.4. Detector de nitrógeno - fósforo	57
2.7.1.3.2.5. Detector fotométrico de llama	59
2.7.1.3.2.6. Detector de fotoionización	60
2.7.1.3.2.7. Detector de conductividad electrolítica	62
2.8. 2.8. Selección de las condiciones de trabajo	65

CAPÍTULO III

Materiales y métodos	59
3.1. Materiales	70
3.2. Equipos	70
3.3. Reactivos	71
3.4. Métodos	71
3.4.1. Procedimiento	71
3.4.1.1. Preparación de estándares - Curva de calibración	72
3.4.1.2. Muestra	73
3.4.1.2.1. Determinación del grado alcohólico	73
3.4.1.2.2. Tratamiento de la muestra	74
3.4.1.3. Lectura por cromatografía de gas	75
3.4.1.3.1. Ajuste de las condiciones cromatográficas	75
3.4.1.3.2. Lectura de estándares por cromatografía de gases	76
3.4.1.3.3. Lectura de la muestra	76

CAPITULO IV

4. Datos y cálculos	78
4.1. Determinación del grado alcohólico	78
4.2. Determinación del área y tiempo de retención de los estándares	78
4.3. Lectura de área y tiempo de retención de las muestras.....	79

CAPÍTULO V	83
5. Discusión de resultados	84
CAPÍTULO VI	86
Conclusiones y recomendaciones	86
6.1. Conclusiones	87
6.2. Recomendaciones	87
Bibliografía	88
ANEXOS	91

The background features a large, faded watermark of the University of the Pacific logo. The logo is an oval shape with a sunburst at the top, a central emblem, and a ribbon at the bottom. The text "UNIVERSITAS MAJOR PACENSIS DIVI ANDREAE" is visible around the perimeter of the oval.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

La producción de bebidas alcohólicas a nivel industrial y artesanal, es el de mayor demanda y consumo a nivel mundial, cada día se incrementan los consumidores de este tipo de bebidas (desde las no destiladas como la cerveza, hasta las destiladas como el ron), donde el contenido alcohólico es elevado.

El consumo masivo y generación de ingresos de este tipo de industria, ha provocado que en muchos lugares del mundo, se elabore de forma casera, bebidas con alto grado alcohólico a bajo precio, sin cumplir con las normas establecidas, creando una serie de complicaciones que van desde financieras y legales, hasta los de salud, ya que al no producirse dentro de industrias confiables que cuentan con estándares de calidad, se elaboran productos que atentan contra la salud y la vida de las personas que las consumen, por la presencia de metanol, como producto contaminante de la fermentación o como producto adulterante, con el cual se diluye el etanol. Debido a la toxicidad que presenta esta sustancia, no debe encontrarse en ninguna formulación de consumo humano, ya que provoca intoxicaciones que pueden ir desde la ceguera permanente hasta cianosis, hipotensión, coma y en el peor de los casos muerte por insuficiencia respiratoria.

Para poder determinar cuantitativamente el contenido de estos alcoholes y otro tipo de componentes se utiliza la cromatografía de gases, que es un método instrumental que se lo aplica en diferentes áreas, como medio ambiente, hidrocarburos, análisis de pesticidas, etc y en este caso en especial nos ayudará a desarrollar el método para la cuantificación de metanol

1.2. ANTECEDENTES

No se conoce métodos desarrollados por las diferentes facultades que se encuentran relacionadas con esta área, específicamente en la determinación y cuantificación de metanol en bebidas alcohólicas por cromatografía gaseosa.

El metanol no es un producto de la fermentación alcohólica, ya que su presencia en este tipo de bebidas se debe a la desesterificación de las pectinas estearasas presentes en las frutas.

El contenido de metanol en vino tinto es de 2,122 mg metanol/L, en vino blanco 1,118 mg/L, en brandy 1,500 mg/L, en whisky 1,000 mg/L y en ron 800 mg/L, aún cuando este tipo de bebidas alcohólicas es destilada para aumentar el contenido de alcohol etílico y disminuir el de otros alcoholes contaminantes.

Como referencia para el presente trabajo se tomará normas oficiales mexicanas donde el límite permisible de este alcohol según las normas: NOM-142-SSA1-1995 y NOM-053-SSA1-1193, es de 30,0 mg/100mL de bebida cuando éstas son destiladas y 30,0 mg/100 mL de alcohol cuando se trata de bebidas fermentadas.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La falta de empleo, educación ha contribuido a que ciertos grupos de la sociedad se dediquen a la comercialización de bebidas alcohólicas y en la mayoría de estos casos a la adulteración y elaboración artesanal

Actualmente en Bolivia, no existe una norma que permita regular el expendio de este tipo de productos; y más aun no existen laboratorios de análisis que determinen la presencia de metanol en bebidas alcohólicas adulteradas por lo que con el presente trabajo pretende determinar la presencia de metanol y su posterior cuantificación, especialmente en bebidas de dudosa procedencia o adulteradas.

Al realizar esta investigación, se pondrá en evidencia la presencia de metanol en este tipo de productos y en alerta a las industrias nacionales, las autoridades de sanidad y a los consumidores, en cuanto a aumentar sus exigencias y

realizar un control de calidad más profundo a este tipo de productos.

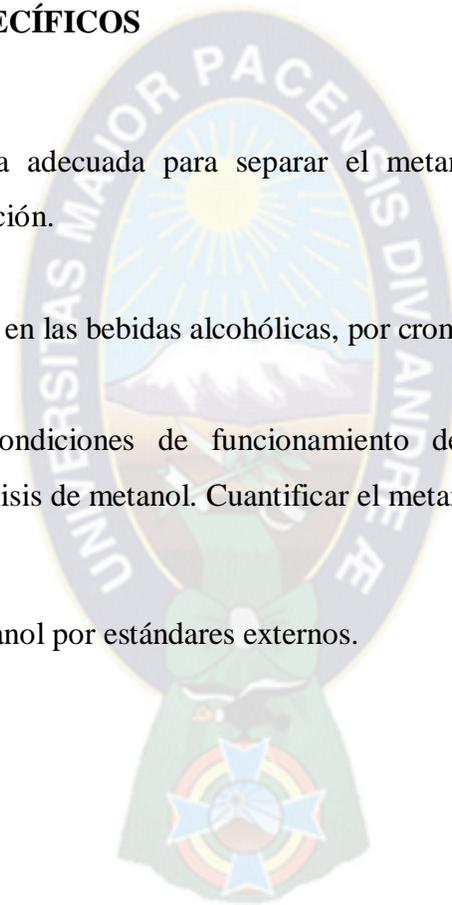
1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método para determinar la presencia de metanol en bebidas alcohólicas por cromatografía de gases.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer la técnica adecuada para separar el metanol por destilación para su posterior cuantificación.
- Separar el metanol en las bebidas alcohólicas, por cromatografía de gases.
- Determinar las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo de gases Shimadzu en el análisis de metanol. Cuantificar el metanol por estándares externos.
- Cuantificar el metanol por estándares externos.



The background features a large, faded watermark of the University of the Pacific logo. The logo is an oval shape with a sunburst at the top, a central shield with a cross, and a banner at the bottom. The text "UNIVERSITAS MAJOR PACENSIS DIVI ANDREAE" is written around the perimeter of the oval.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Las bebidas alcohólicas son aquellas bebidas que contienen alcohol etílico, también llamado etanol. Podemos distinguir diversos tipos de bebidas alcohólicas por su modo de producción, bien sea por fermentación alcohólica o destilación/maceración de sustancias generalmente fermentadas.

2.2. TIPOS DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Bebidas alcohólicas fermentadas: Las bebidas alcohólicas fermentadas son aquellas bebidas que se obtienen tras transformar en alcohol etílico los azúcares que contienen determinadas frutas, raíces o granos de plantas. Mediante este proceso la concentración de alcohol nunca es superior a 17 g por cada 100 g de fermento de alcohol y habitualmente las bebidas elaboradas mediante este proceso tienen un grado alcohólico que oscila entre los 5 y 15 grados. Las bebidas alcohólicas fermentadas más conocidas (y más antiguas) son por ejemplo el vino, la cerveza o la sidra.

Bebidas alcohólicas destiladas: Las bebidas alcohólicas destiladas son aquellas que se obtienen a través de un proceso artificial llamado destilación, por el cual se le aumenta a una bebida fermentada la concentración de alcohol etílico. Estas bebidas suelen tener un grado alcohólico de entre 17 y 45 grados y las más conocidas son por ejemplo la ginebra o el vodka.

Bebidas alcohólicas fermentadas mezcladas con destilados: Las bebidas alcohólicas fermentadas mezcladas con destilados son aquellos vinos (zumo alcohólicamente fermentado) mezclados con un destilado alcohólico. Para que estas mezclas puedan llamarse vinos su grado alcohólico no debe ser mayor de 20 grados. Si por el contrario, es un destilado alcohólico (un aguardiente) el que es mezclado con una pequeña cantidad de vino, el resultado es llamado aguardiente.

2.3 TOXICOLOGÍA DEL METANOL

2.3.1. METANOL

El metanol (CH_3OH) se denomina alcohol metílico o alcohol "de madera" por que originalmente se obtenía de la destilación de esta materia prima en ausencia de aire. Actualmente puede producirse a partir de gas natural, carbón, madera, e incluso de residuos orgánicos (biomasa celulósica). Es el más simple de los alcoholes y se caracteriza por ser incoloro. Fue descubierto por Boyleen 1661en el alquitrán de madera¹

2.3.2. METANOL COMO CONTAMINANTE EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS

El contenido de alcohol etílico en una bebida que no se haya sometido a controles de calidad y sanidad, puede estar diluido o rebajado con metanol, un alcohol derivado de la madera que al metabolizarse ocasiona ceguera permanente. Su ingestión causa ceguera porque destruye irreversiblemente el nervio óptico y una dosis mayor a 30 mL puede causar la muerte.

2.3.3. INTOXICACIÓN POR METANOL

La contaminación con metanol, se produce en el momento de la fermentación de jugos azucarados para la obtención de bebidas alcohólicas, en la cual, además de etanol, se producen también cantidades variables de metanol y otros compuestos volátiles².

El metanol no es un producto de la fermentación alcohólica, ya que su presencia en este tipo de bebidas se debe a la desesterificación de las pectinas estearasas presentes en las frutas.

¹The Merck Index.13° Edición. Merck Co.Inc. Rahway, NJ, USA.

²Intoxicación y Acidosis Metabólica producida por el metanol. 2002. Estados Unidos de América

El límite permisible de este alcohol según las normas oficiales mexicanas NOM-142-SSA1-1995yNOM-053-SSA1-1193, es de 30.00 mg/100 mL de bebida cuando éstas son destiladas y 30.00 mg/100 mL de alcohol cuando se trata de bebidas fermentadas ³.

La intoxicación por metanol ocurre frecuentemente por vía digestiva en el caso de bebidas alcohólicas adulteradas con alcohol desnaturalizado o por vía respiratoria, digestiva o a través de la piel intacta en el caso de exposición en ambientes laborales, desde donde se pueden originar intoxicaciones graves y aún mortales.

El o los individuos pueden sobre vivir dejando como secuela la ceguera irreversible pues la retina, es el sitio de manifestación de la toxicidad del metanol.

El metanol se absorbe con rapidez en el cuerpo por inhalación, por vía oral y tópica, el metabolismo hacia acido fórmico es rápido, y se oxida a dióxido de carbono por una enzima dependiente de la presencia de acido fólico .⁴

La mayor parte de los métodos usados en la determinación de metanol se basan en su oxidación a formaldehído y la posterior determinación de éste último, aunque actualmente por medio de la cromatografía de gases, es posible la determinación del metanol como tal.⁵

El alcohol metílico se absorbe por todas las vías (oral, dérmica y respiratoria), aunque la absorción por piel difícilmente pueda dar lugar a intoxicaciones agudas. Con frecuencia se plantea el problema bajo la forma de intoxicación crónica.

Su carácter irritante genera frecuentes lesiones de entrada, muy típicas en la contaminación crónica por vía respiratoria, como bronquitis crónicas, frecuentemente con componentes asmáticos, y alteraciones en la mucosa de las vías respiratorias altas.

³ Norma Oficial Mexicana NOM - 053 – SSA1 – 1993 . Medidas Sanitarias del Proceso y Uso del Metanol (Alcohol Metílico)

⁴ Klaassen, Curtis; Watkins, Jonh. Manual de Toxicología. 5º Edición.

⁵Uribe, C. Manual de Toxicología Clínica.

Puede provocar neumonía por aspiración pulmonar. El metanol se distribuye rápidamente en los tejidos de acuerdo al contenido acuoso de los mismos, ya que su volumen de distribución es de 0.6 L/Kg de peso. La mayor parte del metanol circula en el agua plasmática. Una vez absorbido se dirige al hígado donde sufre procesos de oxidación a una velocidad 7 veces menor comparada con las del alcohol.⁶

2.3.3.1. INTOXICACIÓN AGUDA

La vía más frecuente de absorción en una intoxicación aguda es la digestiva. La dosis letal varía entre 20 y 100 mL aunque algunos autores informan dosis letales de 240 mL. La muerte por metanol va siempre precedida de ceguera. Se sabe que incluso 15 mL de metanol han causado ceguera y el responsable de ello es el formaldehído.

De acuerdo a la dosis absorbida, las formas de presentación son las siguientes:

Forma Leve: Sensación nauseosa, molestias epigástricas y cefaleas. Si el tiempo de absorción es de algunas horas se presenta visión borrosa.

Forma Moderada: Se producen vómitos. Hay taquicardia y depresión del sistema nervioso central. Si se produce el cuadro de embriaguez, es poco intenso y corto en su duración. La piel está fría y sudorosa, la visión es borrosa y hay taquipnea.

Forma Grave: El paciente está en coma y presenta acidosis metabólica. La respiración es superficial y rápida.

⁶Uribe, C. Manual de Toxicología Clínica. Bogotá.

El color de la piel y las mucosas es frecuentemente cianótico. Las dificultades para respirar pueden llegar al edema agudo de pulmón.

La orina y el aliento huele a formaldehído. Se presenta edema cerebral; coma y a veces convulsiones. Las intoxicaciones graves presentan insuficiencia renal aguda.⁷

2.3.3.2. INTOXICACIÓN CRÓNICA

La exposición crónica al metanol, fundamentalmente por vía respiratoria, produce alteraciones mucosas en las vías respiratorias superiores y en la conjuntiva. Se favorecen extraordinariamente los procesos alérgicos respiratorios, que mejoran en cuanto se evita el contacto con la sustancia.

Si la cantidad absorbida es suficientemente alta, pueden producirse trastornos de la visión que oscilan desde la pérdida de la agudeza visual hasta la ceguera. Las lesiones por contacto se presentan con mayor frecuencia en antebrazos y manos, y se producen por exposiciones prolongadas.

Las intoxicaciones en adultos sedan casi siempre por ingestión de bebidas alcohólicas adulteradas, luego de la cual, la midriasis precoz es signo de mal pronóstico y significa pérdida irreparable de la función visual.

2.3.4. ANATOMÍA PATOLÓGICA

Anatomopatológicamente, se observaron hemorragias cerebrales, edema del encéfalo, áreas necróticas del putamen y desmielinización del nervio óptico. En otros órganos, se observó necrosis pancreática e infiltración grasa de hígado y riñones.

⁷Córdoba, Darío. Toxicología. 4ª. Edición.

En el pulmón y corazón se observaron alteraciones inespecíficas. Ante cualquier sospecha de que la intoxicación pueda deberse a metanol y no a alcohol etílico es necesario buscar ayuda médica, provocar el vómito lo antes posible y hacer que la persona ingiera cualquier bebida que contenga alcohol etílico (no alcohol de uso externo o industrial), para que el hígado metabolice éste y no el metanol.

Con ello se impide que se forme el metabolito que daña el nervio óptico. Esta medida puede salvar la vista del intoxicado.

2.3.4.1. DIAGNÓSTICO

Los criterios para el diagnóstico son:

- Antecedente de ingesta de alcohol
- Visión borrosa
- Respiración rápida y superficial (acidosis)
- Nivel de metanol en sangre. Cifras superiores a 20mg/100 mL son indicativos de intoxicación severa y requieren tratamiento con etanol. Niveles superiores a 50mg/100 mL son indicación para la hemodiálisis.
- Gases arteriales; el pH y la concentración sanguínea de bicarbonato delimitan la gravedad del cuadro.
- Presencia de formaldehído o ácido fórmico en la orina.

2.3.4.2. TRATAMIENTO

- Lavado gástrico con carbón activado en las primeras 4 horas después de la ingestión
- Líquidos parenterales
- Vendaje ocular precoz

- Manejo de la acidosis mediante la administración de bicarbonato de acuerdo con los gases arteriales
- Administración parenteral de etanol (1mg/kg). Se utiliza la infusión endovenosa de etanol absoluto diluido en dextrosa al 5% en AD, para pasar en 15 minutos, continuando con una dosis de 125mg/kg hora para mantener concentraciones sanguíneas de etanol de 100 – 200 mg/dL, las cuales causan ebriedad; este tratamiento se debe mantener por 72 horas.

El etanol se presenta en ampollas de 2 ml y 5ml al 97%; 1 ml de etanol contiene 790 mg de alcohol. Cuando no se cuente con el etanol para vía parenteral, el tratamiento se hace por vía oral, con:

- a. Aguardiente (100 mL tienen 30-35 mL de etanol puro)
- b. Whisky 40-45% de etanol en volumen, o
- c. Vodka 40-45% de etanol en volumen.

La hemodiálisis se utiliza cuando los síntomas progresan a pasar del alcohol etílico, o bien si la concentración de metanol en la sangre es igual o superior a 50mg/100mL.⁸

2.4. EL METANOL Y OTROS COMPONENTES DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

En las bebidas alcohólicas además del etanol pueden encontrarse aldehídos, ésteres y otros alcoholes que producen efectos tóxicos más agudos a concentraciones mucho más altas y que forman parte del buqué de éstas. Ocasionalmente, por violar las buenas prácticas de producción, pueden pasar a los productos terminados cantidades de estas sustancias que resultan peligrosas para la salud de los consumidores.⁸

⁸ Trae, Bev-Lorraine; Dreisbach, Robert. Manual de Toxicología Clínica de Dreisbach, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. 7ª Edición.

Para la detección y cuantificación de los componentes mayoritarios de los rones se utiliza una mezcla patrón de: acetaldehído, acetato de etilo, metanol, n-propanol, isobutanol e isoamílico como estándar. Las muestras tratadas son inyectadas en un cromatógrafo de gases.⁹

2.4.1. ETANOL

El alcohol etílico, constituyente fundamental, que hasta hace poco se utilizaba como parámetro para determinar la calidad del destilado. Es un líquido incoloro, de olor agradable y de sabor ardiente. Se mezcla con el agua en cualquier proporción y es un buen solvente para muchas sustancias colorantes y aromatizantes.

2.4.2 METANOL

El alcohol metílico es quizás el componente más temido por los destiladores. Este alcohol aumenta cuando las condiciones de conservación de los aguardientes no son las adecuadas o cuando el período de conservación es muy prolongado.

2.4.3. ALCOHOLES SUPERIORES

Los alcoholes superiores son los que tienen más de dos átomos de carbono. Tienen sobre el organismo un efecto narcótico muy superior al del alcohol etílico. En los destilados se encuentran en proporciones muy bajas, por lo que fisiológicamente su efecto es modesto.

Se forman algunos durante la fermentación alcohólica y otros como el 2-butanol se forman durante la conservación o ensilado, por lo que es un elemento que distingue los aguardientes de orujo de los de vinos.

⁹Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos Cubano (INHA).

2.4.4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

Son compuestos por átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno; pero unidos de una forma particular, de tal forma que puestos en solución acuosa, liberan iones de hidrógeno, que se perciben por las papilas situadas en los bordes de la lengua, como una sensación ácida. Su presencia en cantidades modestas favorece, tanto el gusto como el perfume de los aguardientes. El de mayor presencia en destilados es el ácido acético, aunque también están presentes el fórmico, el butírico, el láctico, el propiónico, el isovaleriánico, el caprónico, el cáprico y el pelargónico.

2.4.5. ÉSTERES

Son el resultado de la combinación de alcoholes y ácidos orgánicos, compuestos muy abundantes en los destilados. Son numerosos y favorecen las más extraordinarias sensaciones olfativas, tanto positivas como negativas. Entre ellos es mayoritario el acetato de etilo, que no favorece sensaciones exaltantes, pero que es útil por que inhibe la percepción de los aldehídos insaturados y exalta la percepción de algunos olores afrutados.

2.4.6. ALDEHÍDOS

Su estructura inestable, organolépticamente se percibe a reducidas concentraciones. Químicamente se divide en saturados e insaturados. Los primeros dan lugar a sensaciones herbáceas, mientras que los segundos dan sensaciones florales, aunque también son responsables de sensaciones a rancio e incluso a sudor. El compuesto de mayor presencia en los aguardientes es el acetaldehído, seguido del ácido butírico, acetal, furfural. El furfural es muy interesante, pues se forma con el recalentamiento de los aguardientes, y a nivel organoléptico produce olor a quemado.

2.5. LÍMITES DE LOS COMPONENTES EN LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Las bebidas espirituosas, obtenidas a partir de orujos de uva fermentados y destilados a una concentración menor de 86 % v/v, deben cumplir con el contenido en sustancias

volátiles igual o superior a 140g /HL, de alcohol al 100 % y con un contenido máximo de alcohol metílico de 1000g /HL, de alcohol al 100 % .¹⁰

Tabla 1. Límites establecidos por la norma técnica nicaragüense.

COMPUESTOS	LÍMITE MÁXIMO mg/100mL
Metanol	30
Aldehídos	40
Esteres	150
Furfural	4
Alcoholes superiores	400

Fuente: Ministerio de fomento, industria y comercio de Nicaragua, 2000.

Los niveles de metanol máximos permitidos están definidos por las normas INEN y son diferentes para cada tipo de bebida alcohólica. Internacionalmente las normas están establecidas por el CODEX alimentario de la FAO (Tabla N° 2).

LICOR	NIVELES MÁXIMOS PERMITIDOS DE ACUERDO A LAS NORMAS INEN
Aguardiente	10mg/100 ml de alcohol anhidro
Ron	10mg/100 ml de alcohol anhidro
Ginebra	0.25 ml/100 ml de alcohol anhidro
Whisky	15mg/100 ml de alcohol anhidro
Brandy	30 mg/100 ml de alcohol anhidro
Pisco	0.25 ml /100 ml de alcohol anhidro
Vodka	8 mg /100 ml de alcohol anhidro
Anisado	10 mg/ 100 ml de alcohol anhidro
Vino	0.5 ml /100 ml de alcohol anhidro
Vino de frutas	0.02 ml /100 ml de alcohol anhidro
Alcohol etílico rectificado	8mg/100 ml de alcohol anhidro

TABLA N° 2. Niveles máximos permitidos de acuerdo a las normas INEN y el CODEX alimentario de la FAO

¹⁰ (Antonioetal.,2003).

2.6. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica de separación en la cual, los componentes de la muestra, se distribuyen entre dos fases de diferente naturaleza, como consecuencia de la variación de velocidad que se establece al ser arrastrados por una fase móvil, líquida o gaseosa, a través de una fase estacionaria, sólida o líquida.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida.

Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

2.6.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido dando lugar a la cromatografía de gases y a la cromatografía líquida.

En la cromatografía líquida, cuando la separación involucra predominantemente un reparto simple entre dos fases líquidas inmiscibles, una estacionaria y la otra móvil, el proceso se llama cromatografía líquido-líquido (LLC).

Cuando en la aptitud retentiva de la fase estacionaria intervienen principalmente fuerzas físicas de superficie, el proceso se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC, *de liquid-solid chromatography*) (o de adsorción). Otros dos métodos de cromatografía líquida difieren un poco en su modo de acción.

En cromatografía de intercambio iónico (IEC, *de ionic-exchange chromatography*), los componentes iónicos de la muestra se separan por el intercambio selectivo con contra iones de la fase estacionaria.

En cromatografía de exclusión (EC, *de exclusión chromatography*), la fase estacionaria proporciona una clasificación de moléculas basadas en su mayor parte en la geometría y el tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación en gel, en la química de los polímeros, y de filtración en gel, en la bioquímica.

Cuando la fase móvil es un gas, los métodos se llaman cromatografía gas-líquido (GLC), y cromatografía gas-sólido (GSC). Los métodos que implican fases móviles gaseosas y líquidas, serán tratados en forma individual. Aun cuando hay pocas razones fundamentales para estudios separados, las diferencias en las técnicas de operación y en el equipo justifican su análisis en capítulos individuales.

2.7. CROMATOGRAFÍA DE GAS

La cromatografía es básicamente una técnica de separación, su gran capacidad para resolver muestras complejas ha conducido a utilizarla cada vez más como una técnica analítica. Esta utilización, ha conducido al desarrollo de una instrumentación, que utilizando siempre la separación por elución, puede operar en continuo, con mayor eficacia para la separación y con un mayor control de las condiciones cromatográficas para incrementar la reproductibilidad de los resultados.

Entre las técnicas cromatográficas utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases es la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles.

Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fase gaseosa, establece los límites de su utilización, que estarán marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar.

La utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos de con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente de 400 °C; dentro de estos límites, como ya se mencionó, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra.

Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de gas inerte a una elevada temperatura; esta corriente de gas, atraviesa la columna cromatográfica que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas - líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o en muchos casos, por medio de una mezcla de ambos.

Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de un sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestras.

2.7.1. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

El esquema general de un cromatógrafo de gases se muestra en la figura N° 1.

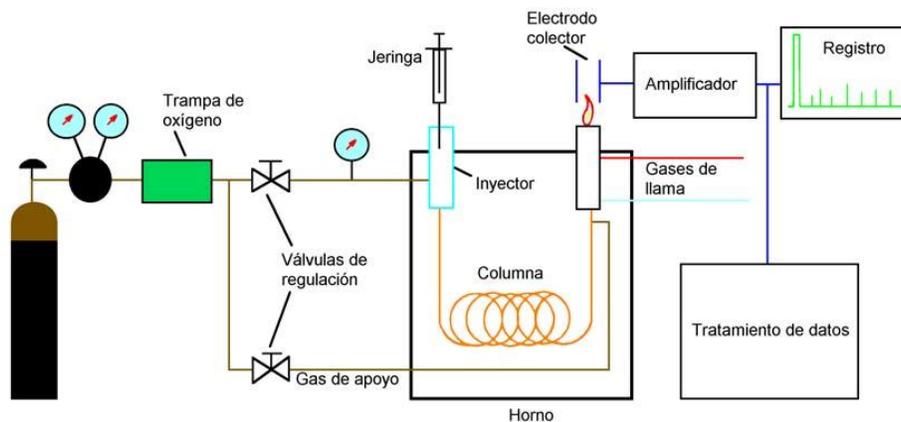


Figura 1. Esquema de un cromatógrafo de gases

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases, son:

- ❖ Fuente de gas
- ❖ Sistema de inyección
- ❖ Horno y columna cromatográfica
- ❖ Sistema de detección
- ❖ Sistema de registro

Los gases portadores utilizados en cromatografía no afectan a la separación ya que no tienen ninguna influencia sobre los procesos de sorción – desorción o de partición que se produce en la columna, por lo que no afectan a la selectividad de esta; de cualquier forma, los términos de difusión en la fase móvil de la ecuación de Van Deemter, si dependen de la naturaleza del gas portador, por lo que las curvas de AEPT (Figura 2) serán ligeramente distintas para cada tipo de gas, lo que a su vez influirá sobre la velocidad óptima de la fase móvil y, en consecuencia los tiempos de análisis.

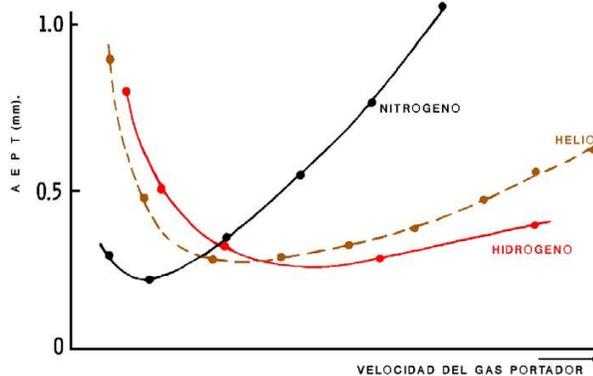


Figura 2. Curvas de AEPT para tres gases portadores de uso habitual

Al margen del efecto que la naturaleza del gas portador puede ejercer sobre la altura de plato, la elección de uno u otro tipo de gas, estará determinada fundamentalmente por el sistema de detección utilizado.

Como fuentes de gas portador se suelen utilizar cilindros de gas comprimido de elevada pureza, capaces de suministrar una presión de gas adecuado y constante; en muchos casos es necesario eliminar las trazas de impurezas que pueda contener el gas (O_2 y H_2O fundamentalmente) que puedan afectar al sistema cromatográfico, por medio de filtros adecuados.

El control de la velocidad del gas portador a través de la columna, se realiza por medio de válvulas que suministran un caudal constante (columnas empaquetadas) o que mantienen constante la presión en la cabeza de la columna (sistemas capilares).

El horno de un cromatógrafo de gases, tiene como misión mantener la columna termostaticada a una temperatura fijada a una gran precisión (dentro de unos límites de $\pm 1^\circ C$) por otro lado, es necesario que el control de termostatación del horno permita incrementar la temperatura de este a una velocidad prefijada y constante (trabajo de técnicas de

temperatura programada), evidentemente, el primer requisito es fácil de cumplir, pero cuando se requiere trabajar con temperatura programada, el horno debe cumplir una serie de requisitos tales como tener una escasa inercia térmica (particularmente si es necesario realizar rampas de temperatura muy rápidas) y poseer un sistema de control de temperatura muy sofisticado que incluya la posibilidad de programar las posibles variaciones de temperatura del horno así como los tiempos a los que se han de realizarse.

2.7.1.1.- SISTEMAS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS

Los dispositivos de inyección de muestras para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

- La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
- La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
- La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.

2.7.1.1.1.- INYECTORES PARA COLUMNAS EMPAQUETADAS

La inyección de muestras en columnas empaquetadas no presenta problemas particulares; este tipo de columnas admiten cantidades de muestra relativamente elevadas, y la inyección de unos cuantos micro litros de muestra no conduce a una disminución apreciable de la eficacia de la columna.

La mayoría de los cromatógrafos comerciales utilizan las cámaras de inyección termostáticas (Fig 3).

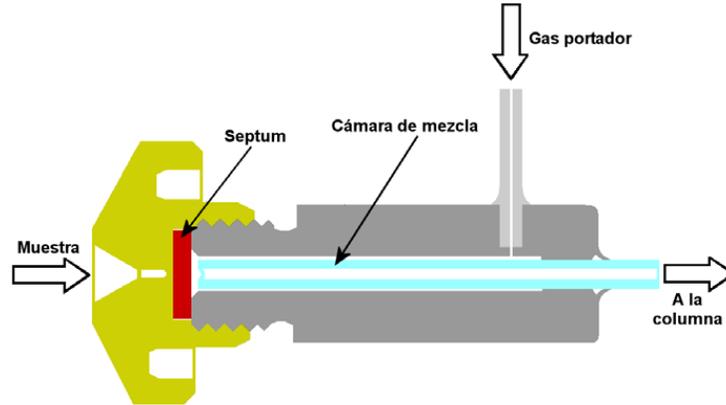


Fig 3. Esquema de un inyector para columnas empaquetadas

Un inyector está formado por un bloque metálico, buen conductor de calor, provisto de un sistema de calentamiento, un termostato capaz de mantener su temperatura constante y un aislamiento térmico adecuado; en el interior de este horno, se encuentra alojado el sistema de inyección (Fig 3). En este el gas portador, previamente calentado, pasa de forma continua en el sistema, la muestra es inyectada en el interior de la cámara, por medio de una micro jeringa de precisión, a través de un diafragma perforable (septum) con capacidad de auto sellado en el momento en que se retira la aguja; una vez inyectada la muestra, esta es vaporizada de forma instantánea, mezclándose con el gas portador, en una cámara de mezcla (“liner”) construida de un material lo más inerte posible (acero inoxidable, nique, vidrio o cuarzo). Una vez vaporizada la muestra, es arrastrada rápidamente por la corriente de gas portador en dirección a la columna.

EL diseño de la cámara de inyección debe ser estudiado minuciosamente, el volumen de la cámara ha de estar proporcionado con el tipo de columna a utilizar para evitar mezclas incompletas o bandas excesivamente anchas, en lo posible, es preciso evitar la formación de turbulencias en el paso de la cámara de inyección a la columna; se ha de evitar cuidadosamente la existencia de volúmenes muertos, no barridos por la corriente del gas

portador, dentro de la cámara para evitar deformaciones de la banda de muestra, el volumen existente entre la cámara de inyección y la columna debe ser el menor posible para evitar

ensanchamientos de banda; la temperatura ha de ser homogénea en toda la cámara de inyección para evitar la discriminación de alguno de los componentes de la muestra, etc.

El sistema de inyección de la muestra de un cromatógrafo es un punto extremadamente crítico y la utilización de una técnica de inyección inadecuada o una mala elección del sistema de inyección pueden echar a perder completamente la capacidad de separación de una columna.

Existen algunos tipos de inyectores que permiten utilizar uno de los extremos de la columna cromatográfica como cámara de mezcla. La introducción de la muestra por medio de este tipo de inyectores (inyección en columna), está libre de muchos de los problemas mencionados anteriormente, además de ofrecer ventajas adicionales tales como permitir la utilización de temperaturas más bajas para la vaporización.

2.7.1.1.2. INYECTORES PARA COLUMNAS CAPILARES

Los sistemas de introducción de muestras utilizadas para trabajar con columnas capilares, están basados sobre los mismos principios de los inyectores utilizados para columnas empaquetadas, por lo que las consideraciones generales sobre ellos siguen siendo válidas.

La diferencia fundamental entre los sistemas que utilizan columnas empaquetadas y los que utilizan columnas capilares, radica en que la cantidad de muestra que estas últimas pueden separar es mucho menor que en el primer caso, por otra parte, las columnas capilares son muy afectadas por los disolventes, de forma que los volúmenes que se pueden inyectar en ellas son extremadamente bajos, dado que no existen jeringas capaces de medir con precisión volúmenes inferiores a 0.1 μL , los inyectores utilizados para trabajar con este tipo de columnas, además vaporizar la muestra y mezclarla con el gas portador, deberán ser capaces de introducir en la columna sólo una alícuota de la muestra total inyectada.

Existen muchas más técnicas de inyección para columnas capilares que para columnas empaquetadas las cuales se describirán a continuación.

a.- INYECCIÓN CON DIVISIÓN DE MUESTRA

Este tipo de inyección (más conocida como inyección “split”), es el más sencillo de los que se utilizan en cromatografía capilar.

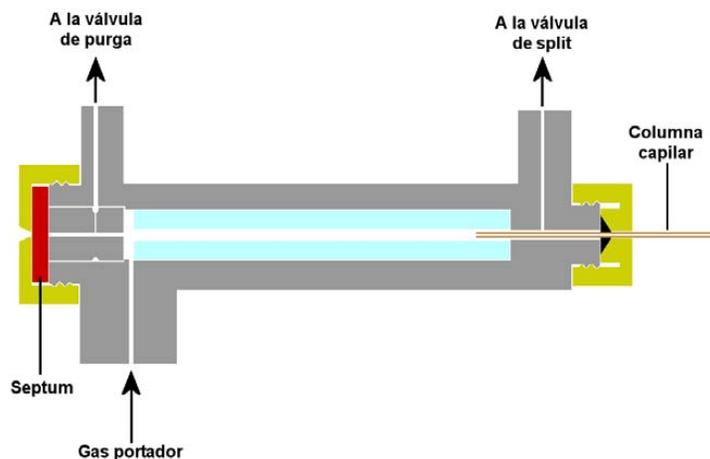


Figura – 4. Esquema de un inyector de “split”

El inyector “split” (fig. - 4), consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo de salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto también la muestra vaporizada), se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la porción más pequeña de gas que es introducido en la columna. Dado que en este tipo de inyectores la mayor parte del caudal del gas portador se dirige hacia la atmósfera, la válvula de “split” dispone de un sistema de apertura y cierre automáticos para que únicamente permita la salida de gas hacia la atmósfera durante el proceso de inyección. El control de flujo de gas portador que pasa a través de la columna, se realiza en este tipo de sistemas manteniéndose constante la presión de la cámara de

inyección, lo que permite que el caudal de gas que pasa a través del inyector pueda variar en función de que la válvula de “split” esté abierta o cerrada.

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes:

- La división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas, por lo que los límites de detección aumentan bastante, lo que es un gran inconveniente a la hora de realizar análisis de trazas.
- Por otro lado los inyectores “split” pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra.

b.- INYECCIÓN SPLITLESS

En la técnica de inyección “splitless”, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra.

La totalidad de la muestra inyectada, lógicamente se condensa en la cabeza de la columna, actuando en este caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurrido un tiempo adecuado, en el inyector una válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector; al mismo tiempo, se comienza un programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis.

La utilización de la técnica de “splitless” supone dos ventajas importantes, uno de ellos que no existe división de la muestra, permitiendo un incremento notable en la sensibilidad, por lo que es muy adecuado en el análisis de trazas.

Por otra parte, la reconcentración de la muestra en la cabeza del columna origina que las pérdidas de eficacia debidas a una inyección inadecuada sean de mucha menor importancia que en otras técnicas de inyección.

El diseño de un inyector de “splitless” es básicamente el mismo que el del inyector de “split” (fig. - 4), pudiéndose realizar la purga del inyector a través de la válvula de Split, ya sea a través de una válvula de purga adicional situada cerca del septum. La mayoría de los inyectores de “split” comerciales, están diseñados para poder trabajar también en modo “splitless”.

c.- INYECCIÓN EN COLUMNA

Uno de los principales problemas de los sistemas de inyección utilizados con columnas capilares, es la posibilidad de discriminación entre los componentes de la muestra durante los procesos de vaporización de la muestra y paso de la muestra vaporizada a la columna. La única forma de asegurarse que la muestra que alcanza la columna corresponde al 100% de la muestra inyectada, realizando la inyección de la muestra directamente en la columna.

Los sistemas de inyección en columna (normalmente conocido por su nombre en inglés como “on-column”), han sido diseñados para posibilitar la introducción de muestras directamente en el interior de las columnas capilares.

La introducción de una muestra por medio de una jeringa directamente en el interior de una columna capilar (de 0.23 mm de diámetro interno), requiere la utilización de agujas extremadamente finas (suelen utilizarse agujas de sílice fundida de 0.15 mm de diámetro) que en consecuencia, son incapaces de perforar un septum.

La característica básica de un inyector “on-column” (fig. - 5), es la utilización de un sistema de válvulas y tubos de guía que permitan la introducción en el sistema de una aguja extremadamente fina.

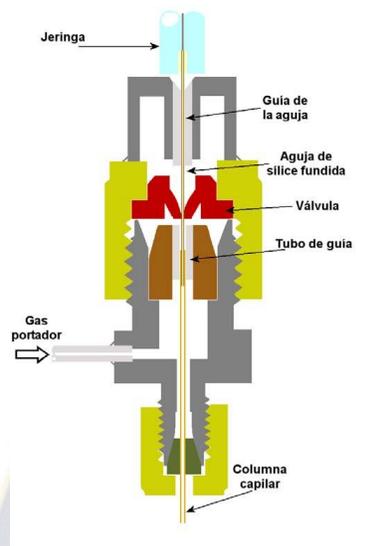


Figura- 5 Esquema de un inyector “on-column”

El método de trabajo utilizado en la inyección “on-column” recuerda en alguna forma al utilizado en la inyección “splitless”, la muestra es introducida directamente en la columna, manteniéndose esta a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra.

Una vez introducida la muestra, se inicia el programa de calentamiento de la columna para proceder la separación.

La gran ventaja que ofrece el sistema de inyección “on-column”, es que reduce la discriminación entre los componentes de la muestra prácticamente a cero, obviándose además todos los problemas que presentan las restantes técnicas de inyección.

d.- OTROS SISTEMAS DE INYECCIÓN

Hasta el momento se han descrito los sistemas de inyección utilizados tradicionalmente en cromatografía de gases, utilizado fundamentalmente para la introducción de muestras en disolución.

Existen otras técnicas de introducción de muestras, algunas de las cuales son de especial interés para el análisis de contaminantes ambientales, a continuación citaremos algunos de ellos:

i. VÁLVULAS DE INYECCIÓN DE GASES

La inyección por medio de válvulas, es muy utilizada para el muestreo automático de gases en sistemas dinámicos. Las válvulas muestreadoras utilizadas en cromatografía de gases son de tipo de seis vías y pueden estar provistas de bucles de carga de capacidad variable.

El esquema de funcionamiento de este tipo de válvulas se muestra en la figura 6.

Válvula de Inyección:

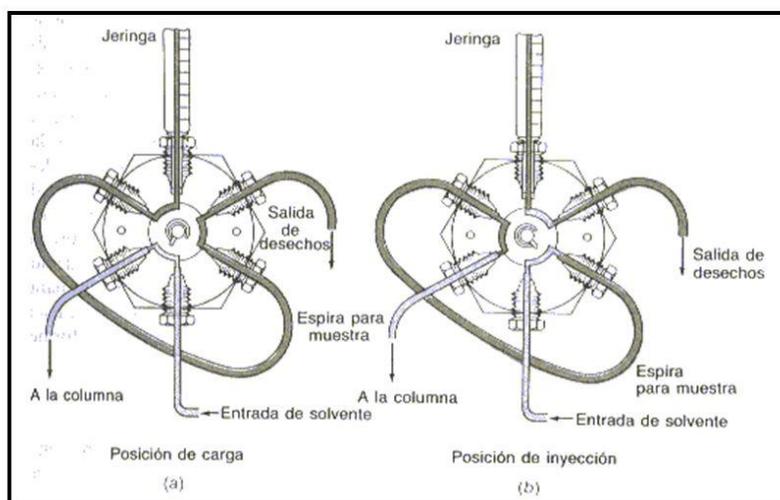


Figura 6. Esquema de una válvula de inyección de gases

ii. DESORCIÓN TÉRMICA

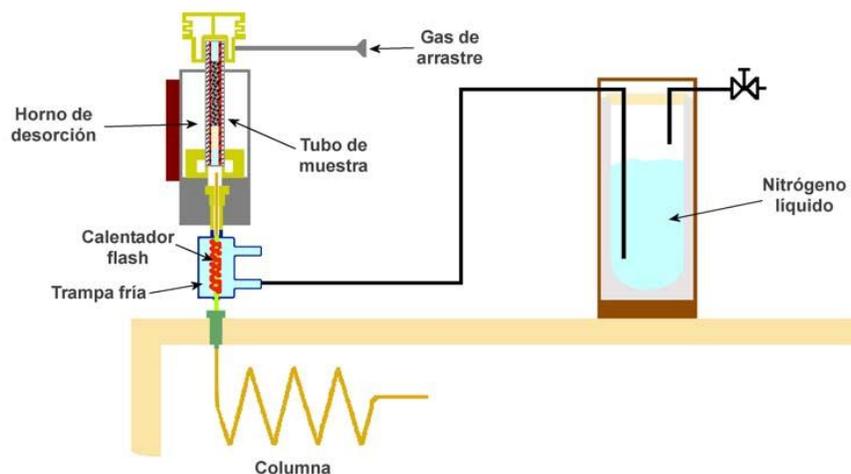


Figura 7. Esquema de un inyector de desorción térmica

Básicamente un equipo de desorción térmica, consta de un horno donde la muestra es desorbida de los tubos de muestreo a elevada temperatura bajo una corriente de gas portador; una vez desorbidos los vapores de la muestra, estos son retenidos en una trampa criogénica hasta la finalización del proceso de desorción, efectuándose la inyección en este momento por medio de un calentamiento muy rápido de la trampa fría. Al contrario de lo que sucede con la inyección de espacio de cabeza, la técnica de desorción térmica si permite realizar buenas cuantificaciones, siempre que se fijen unas condiciones adecuadas para asegurarse que la desorción de la muestra sea total.

iii. INYECTORES DE ESPACIO DE CABEZA

La técnica de análisis por espacio de cabeza es aplicable al análisis directo de contaminantes volátiles en muestras sólidas o líquidas. El fundamento de esta técnica consiste en analizar una alícuota de la atmósfera que se encuentra en contacto con la muestra con el fin de determinar en ella la fracción vaporizada de los componentes que se encuentra en equilibrio con la muestra sólida o líquida.

Para realizar un análisis por medio de esta técnica, la muestra se introduce en un vial herméticamente cerrado y se somete a una temperatura previamente fijada durante un tiempo suficiente para que las distintas fases de los compuestos a analizar alcancen el equilibrio, es decir, hasta que la presión parcial de cada componente en la atmósfera del vial sea igual a su presión de vapor a la temperatura de trabajo.

Un analizador de espacio de cabeza consta de un horno, convenientemente termostalizado, donde se mantienen las muestras a una temperatura generalmente muy elevada y en un sistema de muestreo capaz de inyectar en el cromatógrafo una alícuota del vapor generado por la muestra que contiene el vial. En la figura (7), se muestran dos tipos de sistemas de muestreo:

- i. Una jeringa automática termostalizada
- ii. Un sistema de desplazamiento por presurización.

2.7.1.2. COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Al igual que sucede en todas las técnicas cromatográficas, la columna es el corazón del cromatógrafo de gases. Es necesario tener siempre presente que la columna es el auténtico elemento de separación de los componentes de la muestra, así una mala elección de la columna, una columna deteriorada o unas condiciones de trabajo inadecuadas, nunca permitirán obtener buenos resultados aunque se disponga del mejor equipo en el resto del cromatógrafo, siendo además las causas citadas las responsables de la inmensa mayoría de los problemas que se encuentran a la hora de realizar un análisis por cromatografía de gases.

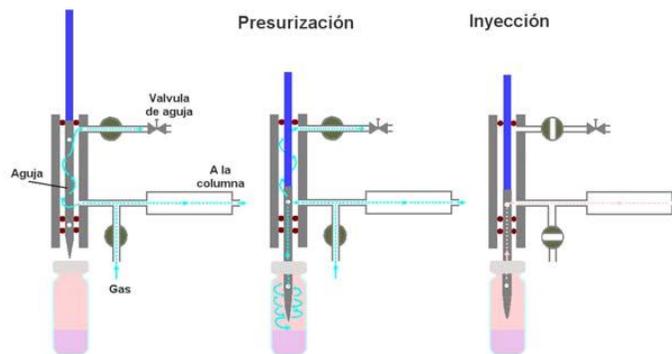
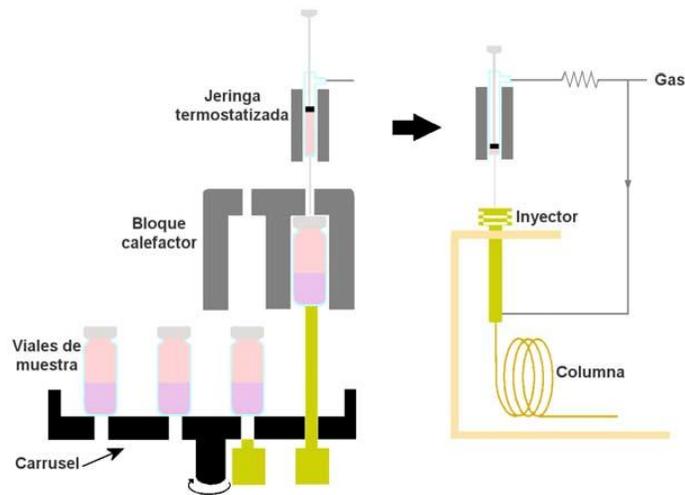


Figura 7. Sistemas de inyección de espacio de cabeza

Una columna para cromatografía de gases, está formada por un tubo, que puede ser de diversos materiales preferiblemente inertes, dentro del cual se encuentra la fase estacionaria.

Esta puede ser un sólido activo (cromatografía gas-sólido), o con mayor frecuencia un líquido depositado sobre las partículas de un sólido portador (columnas empaquetadas o de relleno) o sobre las propias paredes del tubo (columnas tubulares abiertas).

2.7.1.2.1. COLUMNAS EMPAQUETADAS

Las columnas empaquetadas consisten de un tubo de vidrio o acero inoxidable con un diámetro interno que varía entre 2 y 5 mm y de una longitud que oscila entre 1 a 15 m, arrollado de una forma adecuada para introducir en el interior del horno del cromatógrafo (figura 20).



Figura 20. Columnas empaquetadas para cromatografía de gases

En el interior del tubo, se dispone de la fase estacionaria bajo la forma de un líquido soportado sobre un material adecuado finamente pulverizado, el diámetro de las partículas de relleno debe ser, al menos, diez veces inferior al diámetro del tubo, con el fin de conseguir una buena uniformidad en su distribución. El relleno se encuentra confinado en el interior del tubo por medio de tapones de un material poroso de lana de vidrio o lana de cuarzo situado en los extremos.

La longitud y consecuentemente la eficacia de las columnas empaquetadas se encuentra limitada fundamentalmente por la caída de presión del gas portador entre la cabeza y salida de la columna.

2.7.1.2.2. COLUMNAS TUBULARES ABIERTAS

Las columnas tubulares abiertas conocidas también como columnas capilares fueron descritas inicialmente por Golay en 1957 y son las más utilizadas debido a su gran eficacia de separación que proporcionan.

Una columna tubular está formada por un tubo de vidrio o de sílice fundida de un diámetro comprendido entre 0.2 y 0.8 mm, en cuya pared interna se dispone la fase estacionaria. Según sea la forma en que se dispone la fase estacionaria sobre la pared del tubo, se distinguen básicamente dos tipos de columnas (figura 21):

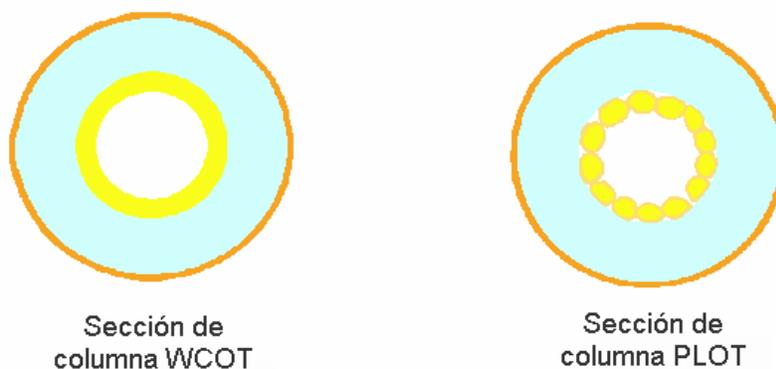


Figura 21. Tipos de columna tubulares abiertas

a.- Columnas WCOT (Wall Coated Open Tubular). En este tipo de columnas (que son de uso más frecuente), la fase estacionaria se encuentra depositada formando una película líquida directamente sobre las paredes del tubo.

b.- Columnas PLOT (Porous Layer Open Tubular). En estas columnas la pared interna del tubo está recubierta por una capa de un soporte adsorbente; si a su vez el soporte está impregnado con una fase estacionaria líquida, las columnas son denominadas SCOT (Support Coated Open Tubular).

Es evidente que la permeabilidad de las columnas tubulares hacia los gases es mucho mayor que la de las columnas empaquetadas, del orden 100 veces mayor, por lo que este tipo de columnas pueden tener una longitud bastante grande, son muy frecuentes columnas de 50 m, sin provocar presiones excesivamente elevadas en la cabeza de la columna.

El enorme uso que se hace de este tipo de columnas es debido fundamentalmente a la elevada eficacia que ofrecen, son frecuentes valores de 30 00 a 50 00 platos frente a los 2 00 a 4 000 de una columna empaquetada, entonces permite la separación de mezcla muy complejas con relativa facilidad; por otra parte, la gran eficacia de este tipo de columnas permite conseguir buenas resoluciones sin recurrir a fases estacionarias de gran selectividad, lo que simplifica la elección de la fase estacionaria.

El principal inconveniente de este tipo de columnas es su pequeña capacidad de carga, lo que obliga a utilizar sistemas de inyección especiales para introducir pequeñas cantidades de muestra y detectores de muy alta sensibilidad, no obstante, tanto las columnas SCOT como las WBOT de diámetros mayores de 0.5 mm (columnas “Wide Bore”) ofrecen una capacidad de carga suficiente como para poder inyectar cantidades del orden de 1 μ L sin utilizar un splitter con una pérdida de eficacia relativamente pequeña.

Las columnas de este tipo tienen una utilización muy alta en el campo de análisis de trazas.

2.7.1.2.3. SOPORTE SOLIDO

La misión de los soportes sólidos en algunos tipos de columna es la de proporcionar una superficie sobre la que se deposita la fase estacionaria líquida en forma de película uniforme.

Los soportes utilizados en cromatografía de gases deben reunir una serie de cualidades como:

- Deben presentar una superficie específica relativamente elevada, con el fin de que la fase estacionaria pueda distribuirse de forma uniforme y ofreciendo la máxima superficie de contacto con la fase móvil para facilitar los procesos de intercambio.
- Debe ser porosos, con el fin de no provocar caídas excesivas de presión.
- Deben ser relativamente duros para que sus partículas no se rompan durante los procesos de impregnación y llenado de las columnas.
- Deben ser térmicamente estables.
- La superficie de los soportes debe ser químicamente inerte y no deben provocar fenómenos de adsorción que puedan influir en la separación cromatográfica.

Como soportes, se han utilizado sólidos inertes de todo tipo, micro bolas de vidrio, carbón grafitizado, metales, sílices, fluoropolímeros, polímeros porosos, etc. los más utilizados son los soportes preparados a base de tierras diatomeas sinterizadas (Cromosorb, Gas Chrom, etc), la superficie de estos materiales se somete a diversos tratamientos químicos; lavados ácidos o básicos, silanización de grupos silanol libres, ligado de pequeñas cantidades de fases estacionarias, etc, con el fin de eliminar, los puntos activos de la superficie del soporte que pudiesen interaccionar con los compuestos a separar.

En la tabla N° 3 se dan a conocer las propiedades de algunos soportes diatomaceos típicos

El tamaño de partícula de los soportes, a pesar de que según la ecuación de Van Deemter la eficacia de la columna aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de relleno, existe un límite inferior debido a la resistencia al flujo de gas que se oponen a los lechos cromatográficos formados por partículas muy finas.

En la práctica, los tamaños de partícula utilizados varían entre 40 y 120 mallas A.S.T.M. (420 – 125 μm), siendo las granulometrías más frecuentes las de 60 - 80; 80 - 100 y 100 - 120 mallas.

SOPORTE	COLOR	pH	SUPERFICIE ESPECÍFICA m^2/g	DENSIDAD g/mL	CARGA MÁXIMA DE FASE ESTACIONARIA
Chromosorb P	Rosado	6.5	4.0	0.47	30 %
Chromosorb A	Rosado	7.1	2.7	0.48	25 %
Chromosorb G	Blanco	8.5	0.5	0.58	5 %
ChromosorbW	Blanco	8.5	1.0	0.24	20 %
Chromosorb 750	Blanco	-	0.5 -1.0	0.36	7 %

Tabla Nº 3. Propiedades de algunos soportes diatomáceos

2.7.1.2.4. FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria en cromatografía de gases juega un papel fundamental, ya que la fase móvil es cromatográficamente inerte y las separaciones son debidas exclusivamente a las interacciones específicas que se dan entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.

Las propiedades de una fase estacionaria con frecuencia son contradictorias, por lo que no existe una fase estacionaria ideal.

Las propiedades que debe cumplir una fase estacionaria son:

- Debe tener el rango de temperaturas de utilización lo más amplio posible, idealmente entre – 60 y 400 °C.

- La presión de vapor debe ser lo más baja posible.
- Debe ser térmicamente estable.
- Debe ser químicamente inerte.
- Debe tener baja viscosidad en las condiciones de trabajo.
- Debe mojar bien el soporte, presentando además una adherencia suficiente como para que no sea arrastrada por la fase móvil.

Además de cumplir estos requisitos generales, la fase estacionaria debe ser selectiva frente a los compuestos a separar, es evidente que no existe ninguna fase estacionaria que cumpla con todos los requisitos anteriores, aunque para realizar separaciones a temperaturas elevadas, la utilización de polímeros líquidos de elevado peso molecular ofrece resultados bastante buenos.

A nivel molecular, la retención del soluto por la fase estacionaria se debe a cualquiera de los siguientes tipos de fuerza intermolecular:

1. Fuerzas de dispersión (fuerzas de London). Este tipo de fuerzas debidas a los campos eléctricos producidas por dipolos instantáneos debidos al movimiento relativo de los núcleos y electrones. Las fuerzas de dispersión son las únicas que actúan entre fases estacionarias y solutos no polares.
2. Fuerzas de inducción (fuerzas Debye). Este tipo de fuerzas son debidas a la interacción electrostática que se produce entre dipolos instantáneos, formados en moléculas no polares aunque polarizables, inducidos por los primeros.
3. Fuerzas de orientación (fuerzas de Keesom). Son debidas a la interacción entre dipolos permanentes, tanto de la fase estacionaria como del soluto.

4. Fuerzas donador – aceptor. Son debidas a las interacciones químicas de carácter débil (enlace hidrógeno), en las que se produce una transferencia no completa de electrones por parte del donador hacia el aceptor.

Para compuestos no polares, las únicas fuerzas de interacción entre el soluto y la fase estacionaria son las dispersivas; este tipo de fuerzas no son selectivas, y en las separaciones basadas en este tipo de fuerzas los solutos emergen de la columna, por lo general en orden correspondiente a sus puntos de ebullición.

Para los compuestos polares, las interacciones de mayor importancia son las debidas a fuerzas de inducción y orientación; en algunos casos a interacciones electrónicas específicas de tipo donador – aceptor donde este tipo de fuerzas dependen del momento dipolar y de la capacidad de polarización tanto de la fase estacionaria como del soluto.

La suma de todas estas interacciones entre un soluto y una fase estacionaria es una medida de la polaridad de la fase respecto al soluto que marca las características generales de retención, mientras que la magnitud de cada uno de los tipos de interacciones particulares marcará la selectividad de la fase estacionaria que es de gran importancia ya que permite separar una fase estacionaria concreta solutos de igual polaridad.

2.7.1.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS FASES ESTACIONARIAS

La característica de mayor interés en el instante de seleccionar una fase estacionaria concreta es el rango de temperaturas de trabajo, la viscosidad de la fase dentro de este rango y su capacidad para interaccionar de forma selectiva con diferentes solutos.

Como norma general, la temperatura más baja de utilización de una fase estacionaria corresponde a su temperatura de fusión. El límite superior de temperatura de una fase estacionaria es la temperatura más elevada a la que se puede mantener sin que se produzcan descomposiciones o sangrados significativos.

Muchas fases estacionarias poliméricas presentan una dispersión importante en su rango de sus pesos moleculares, por lo que los oligómeros que puedan contener se evaporarán dejando la columna con una proporción de la fase estacionaria mucho menor de lo previsto; en estos casos, la máxima temperatura de uso se define como aquella a la que se puede mantener la fase estacionaria durante 24 horas sin cambios apreciables en las características de retención de la columna.

Las características de retención de una fase estacionaria (polaridad y selectividad) se determinan mediante el método de McReynolds. El sistema Rohrschneider/McReynolds está basado en la actividad de las fuerzas de atracción intermoleculares, que pueden ser evaluadas a partir de las diferencias de los índices de retención de una serie de compuestos de prueba en la fase estacionaria que se trata de caracterizar y en escualano una fase apolar de referencia.

Las constantes de caracterización propuestas inicialmente por Rohrschneider (X^* , Y^* , Y^* , U^* , y S^*), se calculaban en base a la retención del benceno, etanol, 2 – butanona, nitrometano y piridina. En el método sugerido por McReynolds se utilizan 10 compuestos de prueba (tabla 2), aunque para la caracterización rutinaria se utilizan únicamente las cinco primeras constantes (X^* a S^*).

La determinación práctica de las constantes de McReynolds se realiza midiendo para cada uno de los compuestos de prueba el índice de retención de Kovats en la fase que se trata de caracterizar y en escualano. El índice de retención de Kovats se define por medio de la ecuación:

$$I = 100z + 100n \left[\frac{\log t_r^*(x) - \log t_r^*(z)}{\log t_r^*(z+n) - \log t_r^*(z)} \right]$$

- I : Índice de retención de la sustancia "x"
 $\log t_r(x)$: Tiempo de retención corregido de la sustancia "x"
 z : Número de átomos de carbono de un n-alcano que eluye de la columna antes que la sustancia "x".
 $z+n$: Número de carbonos de un n-alcano que eluye después de la sustancia "x".
 $t_r(x) + t_r(z+n)$: Tiempos de retención corregidos de los n-alcanos.

A partir de los índices de retención, cada constante de la fase estacionaria se determinará por diferencia entre el índice de retención del compuesto de prueba en ella y en escualano, así por ejemplo, al constante X' de una fase estacionaria se calcula por la ecuación:

$$X' = \Delta I_{(\text{benceno})} = I^{\text{fase}} - I^{\text{escualano}}$$

La determinación de las constantes de McReynolds se realiza normalmente con una temperatura de columna de 100 – 120 °C y con un recubrimiento de la fase estacionaria de 10 – 20 %.

Las constantes de McReynolds pueden utilizarse no solamente para caracterizar las fases estacionarias, sino también como guía de selección de la fase a utilizar para la separación de un compuesto determinado atendiendo a su funcionalidad; si se trata de separar una serie de compuestos con una función común, en su primer intento se podría seleccionar una fase estacionaria con un valor elevado de las constantes de McReynolds relacionadas con el grupo funcional común a fin de que la fase estacionaria tenga una selectividad elevada. Estas constantes caracterizan a las fases estacionarias en una primera aproximación, en ocasiones se pueden encontrar fases estacionarias con selectividades muy diferentes a pesar de tener muy similares los valores de las constantes de McReynolds.

SIMBOLO	COMPUESTO DE PRUEBA	INTERACCIÓN MEDIDA	GRUPO FUNCIONAL IMPLICADO
X`	Benceno	Fuerzas de dispersión y propiedades débiles de aceptor de protones	Aromáticos y olefinas
Y`	1-butanol	Fuerzas de orientación y capacidad de donar y aceptar protones	Alcoholes, nitrilos y ácidos
Z`	2-pentanona	Fuerzas de orientación y capacidad de aceptar protones.	Cetonas, éteres, aldehídos, ésteres, epóxidos, dimetilaminoderivados.
U`	Nitropropano	Fuerzas de orientación	Nitrilos y nitroderivados
S`	Piridina	Fuerzas de orientación débiles y capacidad aceptora de protones	Bases aromáticas
H`	2-metil-2-pentanol		Compuestos ramificados, particularmente alcoholes
J`	2-iodobutano		Compuestos halogenados
K`	2-octino		
L`	1,4-dioxano	Fuerzas de orientación y capacidad de aceptar protones	
M`	Cis-hindrindano		

Tabla 4. Compuestos utilizados y significados de las constantes de McReynolds

2.7.1.2.6. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNAS FASES ESTACIONARIAS

En cromatografía de gases, pueden llevarse a cabo la mayoría de las separaciones utilizando unos cuantos tipos de fases estacionarias de uso frecuente, sintetizadas específicamente para este uso, a continuación describiremos algunos tipos de estas fases estacionarias:

HIDROCARBUROS

Desde los principios de la cromatografía de gases, se han utilizado como fases estacionarias apolares hidrocarburos de elevado peso molecular (escualano, grasas de apiezón), etc.

Las únicas fuerzas de interacción que se tienen con este tipo de fases son las de dispersión, por lo que los compuestos cromatografiados eluirán de las columnas que se utilicen este tipo de fases en orden de volatilidad y en algunos de los compuestos muy polares, en orden inverso a su hidrofobicidad.

Este tipo de fases estacionarias es muy utilizado como referencia para la caracterización de otras fases estacionarias, utilizándose fundamentalmente con este fin es el escualano.

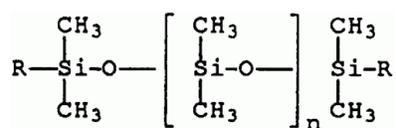
El escualano presenta el inconveniente de tener una temperatura máxima de trabajo muy baja de 120 °C, por lo que en ocasiones se ha propuesto su sustitución por el apiezón MH o por el hidrocarburo de Kovats o apolano – 87.

El principal inconveniente de este tipo de fases estacionarias es su facilidad de oxidación, que lleva normalmente a una alteración de sus características de retención y en elevados casos a un elevado sangrado por fragmentación de las cadenas hidrocarbonadas.

POLISILOXANOS

Los polisiloxanos o siliconas son el grupo de las fases estacionarias de más amplia utilización debido a su elevada estabilidad térmica y a la posibilidad de modificar químicamente la estructura de base para obtener fases con diferentes polaridades y selectividades.

Los polisiloxanos presentan como base la estructura:

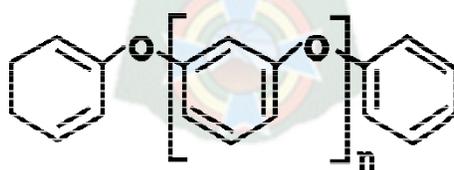


Donde R puede corresponder a grupos metilo, vinilo, fenilo, 3,3,3-trifluoropropilo, cianoetilo, etc., donde toda la estructura puede estar sustituido por un único grupo o por mezclas de cualquiera de los citados en cualquier proporción.

Para el uso de estos materiales en cromatografía de gases, estos deben ser extraordinariamente puros, no debiendo contener restos del catalizador de polimerización o de oligómeros; los grupos terminales de los polímeros deben ser bloqueados cuidadosamente para maximizar la estabilidad térmica. Los polisiloxanos presentan una excepcional inercia, tanto térmica como química.

Las grandes posibilidades de variación estructural que tienen estos compuestos hacen que sea posible obtener fases estacionarias enormemente selectivas. En este sentido, los fenil, cianopropil y trifluoropropilpolisiloxanos presentan muy buenas características de selectividad.

POLIFENILÉTERES



Son fases estacionarias moderadamente polares, químicamente bien caracterizadas y de utilidad para realizar muchas separaciones.

Su volatilidad es extraordinariamente baja dado su pequeño peso molecular (para valores de $n = 2$ y 3 , son estables hasta 200 y 250 °C respectivamente), por lo que los polímeros de este tipo presentan un valor promedio de 20 anillos tienen gran utilidad para realizar separaciones a elevadas temperaturas, hasta 400 °C.

POLIÉSTERES

Los poliésteres son un grupo de polímeros resinosos formados por policondensación de un ácido polibásico con un polialcohol. Los poliésteres utilizados con más frecuencia como fases estacionarias son los adipatos y succinatos de etilenglicol, dietilenglicol y butanodiol; particularmente, es muy utilizado el polietilenglicolsuccinato (PEGS)

Los poliésteres son fases estacionarias moderadamente polares. Las columnas preparadas con este tipo de fases presentan el problema de su escasa estabilidad ya que los poliésteres son fácilmente hidrolizables, pueden reaccionar con algunos componentes de las muestras, por ejemplo las aminas y son muy sensibles a la oxidación; por estos motivos, la utilización de poliésteres como fase estacionaria ha disminuido bastante.

POLIETILENGLICOLES

Los polietilenglicoles son fases estacionarias muy útiles para la separación de compuestos polares y con posibilidades de formación de enlaces de hidrógeno. Este tipo de fases estacionarias se preparan por polimerización del óxido de etileno.

Los polímeros así formados se separan en fracciones de diferente peso molecular promedio, lo que da lugar a todo el rango de fases estacionarias de este tipo.

El factor fundamental que marca las características de retención de este tipo de fases es la concentración de grupos hidroxilo y en menor grado el peso molecular promedio de la fase. Este último factor si tiene por el contrario una gran influencia sobre la estabilidad térmica de la fase; así, el Carbowax 20 M, con un peso molecular promedio de $14\ 000$, tiene una temperatura máxima de utilización de 225 °C, mientras que el Superox-4, con un

peso molecular promedio de 4 millones, es utilizable de hasta temperaturas de 300 °C. El principal inconveniente que presenta este tipo de fase estacionaria es la facilidad que tiene a oxidarse.

FASES ESTACIONARIAS LIGADAS

En general, uno de los factores que influye en la temperatura límite de utilización de las fases estacionarias, particularmente de baja viscosidad, es la tendencia de estas a ser arrastradas por la corriente del gas portador a medida que la viscosidad de la fase va disminuyendo por efecto del aumento de la temperatura; este efecto tiene una particular importancia en el caso de las columnas capilares dado que las paredes internas del tubo, que carecen de irregularidades, no tienen buenas características estructurales para mantener una película líquida.

Una solución a este problema, consiste en inmovilizar químicamente la fase estacionaria, bien sea por anclaje químico de la fase líquida sobre la superficie del soporte o de la pared del tubo capilar, bien por entrecruzamiento químico de las moléculas de la fase estacionaria para formar un retículo tridimensional de escasa movilidad.

Estas fases estacionarias son conocidas como fases ligadas o fases inmovilizadas y presentan una serie de ventajas sobre las fases estacionarias convencionales, en primer lugar, las fases inmovilizadas ofrecen temperaturas de utilización más elevadas que las fases convencionales, teniendo además un menor nivel de sangrado a temperaturas elevadas; por otro lado, dado que las fases de este tipo son prácticamente insolubles, son mucho menos afectadas que las fases normales por la inyección de elevados volúmenes de disolvente. Una ventaja adicional de este tipo de fases es que las columnas contaminadas por componentes no volátiles por componentes no volátiles de las muestras pueden ser regeneradas mediante un lavado con disolventes adecuados.

La utilización de las fases ligadas está particularmente extendida en las columnas tubulares abiertas, en la mayor parte de las columnas de este tipo se utilizan fases inmobilizadas, pero es frecuente encontrar también este tipo de fases ligadas sobre soportes diatomáceos o sobre sílices, para su utilización en columnas empaquetadas (Ultra-bond, Durapak, Porasil, etc.).

2.7.1.2.7. ELECCION DE LA COLUMNA

La elección de la columna para realizar una separación concreta por cromatografía de gases, es normalmente la tarea más complicada del desarrollo de un método, por otra parte es el factor principal del que dependerá el éxito o el fracaso del desarrollo.

La elección de la columna cromatográfica es normalmente un trabajo empírico; no obstante, como norma general se puede recomendar los siguientes pasos:

Búsqueda de metodologías existentes

Existe en la bibliografía una enorme cantidad de separaciones descritas y en muchos casos es posible encontrar, incluso sin realizar una búsqueda exhaustiva, una metodología adecuada para la separación que se desea realizar. En otros casos se puede encontrar metodologías desarrolladas para compuestos de estructura similar a los que se trata de separar, pudiéndose utilizar estas condiciones como punto de partida del método a desarrollar.

Utilización de columnas capilares

Las columnas capilares pueden proporcionar eficacias muy altas, por lo que es relativamente fácil que una columna capilar pueda realizar una separación concreta únicamente en base a su eficacia. Las columnas capilares solamente son asequibles de forma comercial con una variedad muy limitada de fases estacionarias normalmente de 6 ó 7, que cubren todo el rango de polaridades; la sección de una columna de una columna

concreta es fácil de realizar atendiendo a la naturaleza química de los compuestos a separar y a las constantes de McReynolds de las fases estacionarias asequibles.

Utilización de columnas empaquetadas

En el caso de la instrumentación disponible no permita la utilización de columnas capilares, de que la muestra a separar no sea adecuada para trabajar con ellas, como la necesidad de inyectar cantidades elevadas, problemas de discriminación en la inyección, etc.; o de la eficacia necesaria para realizar la separación, calculada en base a la ecuación de resolución, sobrepase unos límites razonables, es necesario recurrir a la utilización de columnas empaquetadas.

La utilización de columnas empaquetadas permite en muchos casos, a pesar de la escasa eficacia que ofrecen, conseguir separaciones muy complejas en base a la selectividad de la fase estacionaria, ya que en este caso existe una enorme variedad de fases con características diferentes entre las cuales se puede elegir una apropiada. La selección previa de una fase estacionaria puede realizarse en base a la estructura de los compuestos a separar y a las constantes de McReynolds de las fases, que darán una idea del tipo de interacciones en que estará basada la separación así como de los grupos funcionales de las moléculas de soluto que puedan estar implicados.

Utilización de fases mixtas

Un sistema de conseguir selectividades muy elevadas en cromatografía de gases es la utilización de mezclas de dos o más fases estacionarias. La preparación de fases mixtas puede realizarse de diferentes formas:

- a. Fragmentos de empaquetado, cada uno con una fase estacionaria diferente, dispuestos en serie a lo largo de la columna.

- b. Columnas de lecho mixto, en las que cada una de las fases estacionarias, ya depositadas sobre un soporte adecuado, se mezclan en proporciones adecuadas.
- c. Rellenos propiamente de fase mixta, en los que las fase estacionarias son mezcladas antes de depositarlas sobre el soporte sólido.

La utilización de fases mixtas adecuadas permite conseguir una enorme variedad de propiedades de retención. En general las fases mixtas presentan unas propiedades de retención que son intermedias entre las de las fases que componen la mezcla; existen métodos de cálculo teórico para predecir el comportamiento de una fase mixta a partir de los datos de retención de una mezcla en cada una de las fases estacionarias individuales, por lo que la utilización de fases mixtas es muy utilizada para conseguir un “ajuste fino” de las propiedades de retención de una fase estacionaria; no obstante, y tal vez sea este el caso más interesante, cuando se realiza una mezcla de fases de polaridades muy diferentes, el comportamiento de la fase mixta es absolutamente diferente del que muestran por separado cada uno de sus componentes.

Evidentemente, la separación de una mezcla puede llegar a requerir, si es necesario recurrir a la utilización de selectividades especiales, una cantidad inmensa de trabajo, por lo que es preciso tener en cuenta que el desarrollo de una metodología de separación compleja solo está justificado cuando en número de muestras a analizar con ella sea suficiente como para justificar el trabajo invertido o cuando exista una imposibilidad absoluta de realizar el análisis de una muestra de gran interés por medio de cualquier otra técnica.

2.7.1.3. DETECTORES

Una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna, se hace preciso disponer a la salida de esta un sistema de detección, capaz de señalar la elución de

un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través de él.

Los detectores utilizados en cromatografía de gases son de tipo diferencial, no ofrecen señal cuando pasa por ellos solamente el gas portador y responden ante alguna propiedad que pueda variar cuando este se encuentra mezclado con alguna sustancia eluida en la columna.

2.2.2.3.1.- PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE UN DETECTOR

Señal del detector

El detector mide una propiedad que diferencia el gas portador de la mezcla gas portador/sustancia eluida.

El cambio medido por el detector, denominado señal (S), es proporcional a la magnitud de la propiedad a la que responde (a), a una constante propia del diseño del detector (k) y al número de moléculas de la sustancia eluida que en un momento dado estarán presentes en el detector (N); la expresión de la señal del detector será:

$$S = k a N$$

La señal ofrecida por el detector en un momento dado, será la suma de las señales de cualquier sustancia eluida, del gas portador y de las impurezas de este:

$$S_t = S_g + S_i + S_1 + S_2 + S_3 + \dots$$

La señal de medida por el detector en ausencia de sustancias eluidas, se denomina señal de fondo del detector.

Sensibilidad

La sensibilidad de un detector hacia una sustancia eluida, puede definirse como el cambio en la señal medida (ΔS), originado por un cambio en la concentración en el gas portador de la sustancia eluida (ΔN_s). A partir de la ecuación de definición de señal, la sensibilidad de un detector puede expresarse por medio de la ecuación:

$$\frac{\Delta S}{\Delta N_s} = k a_s$$

Es decir que la sensibilidad de un detector hacia una sustancia estará dada por el producto de la constante de diseño del detector y el valor de la propiedad analizada de la sustancia eluida.

Linealidad

La linealidad de un detector, l , se define como la constante de proporcionalidad de la relación entre el logaritmo de la señal ofrecida por el detector y el logaritmo de la concentración de la sustancia eluida:

$$\text{Log } S = \log (k a_s) + l \log N_s$$

Representando esta ecuación (figura 9) se obtiene una recta cuya pendiente es l y cuya ordenada en el origen es $\log (k a_s)$, es decir el logaritmo de la sensibilidad.

Es relativamente frecuente encontrar evaluaciones de la linealidad de los detectores en coordenadas lineales, en estos casos, se denominan detectores lineales aquellos para los que $l = 1$, denominándose detectores no lineales los restantes. La utilización de coordenadas lineales no es correcta, ya que muchos detectores muestran dependencias de la señal con la concentración de tipo exponencial, dejando al margen las desviaciones producidas por la amplificación electrónica de la señal; en cualquier caso, es preferible realizar la evaluación de la linealidad del detector en términos de coordenadas logarítmicas.

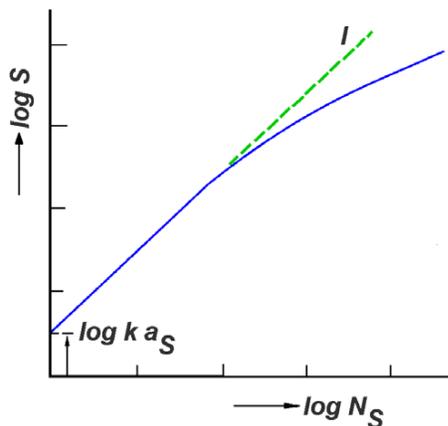


Figura 9. Gráfico concentración respuesta de un detector

El intervalo de concentraciones para que la linealidad no cambie, es conocido como el rango dinámico lineal del detector.

Mínima cantidad detectable

La señal de fondo medida por un detector, fluctúa con el tiempo debido a la inconstancia de los parámetros experimentales, las cuales pueden ser consideradas como errores aleatorios de la medida y son denominadas ruido. El nivel de ruido oscila continuamente alrededor de una señal promedio, dando el conjunto de sus valores a lo largo del tiempo una distribución que vendrá definida por su desviación estándar. El valor de señal correspondiente a la mínima cantidad detectable, podrá calcularse en base al valor de incremento de señal necesario (ΔS) para ser significativamente diferente del resto de la distribución.

Considerando un número suficiente de medidas de señal de fondo, se puede calcular que una señal es significativamente distinta del ruido, con un 95 % de probabilidad, cuando su valor es dos veces superior al intervalo de ruido; de forma análoga, cuando se incrementa la

probabilidad hasta un 99 %, la señal debe ser al menos 2,65 veces mayor que el nivel de ruido para ser significativamente distinta.

La evaluación del nivel requerido para que una señal sea significativamente diferente del ruido, está realizado en base a considerar una señal instantánea, no obstante la situación es extrapolable a medidas reales haciendo la consideración de que la señal evaluada corresponde al valor máximo del pico de elución (figura 10), siendo evaluable de forma cuantitativa todo pico que cumpla estas condiciones.

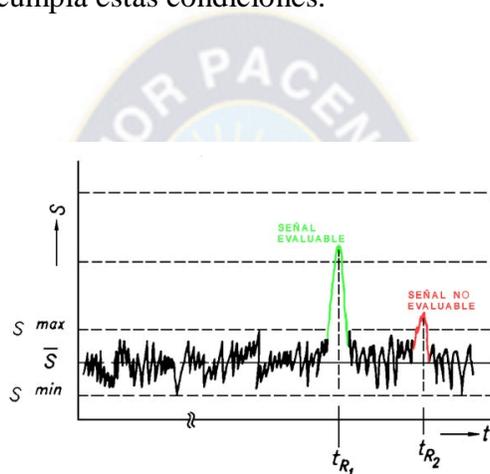


Figura 10. Parámetros de la relación señal/ruido de dos bandas cromatográficas

2.7.1.3.2. TIPOS DE DETECTORES

Los detectores usados en cromatografía de gases, pueden dividirse de forma genérica en detectores universales y detectores específicos; los primeros ofrecen una ventaja de responder prácticamente ante cualquier compuesto que pueda eluir de la columna, no obstante, esta misma propiedad puede convertirse en un serio inconveniente cuando se procede al análisis de mezclas muy complejas, en este último caso, la utilización de detectores específicos resulta muy ventajosa ya que, al responder únicamente frente a un grupo limitado de compuestos, los cromatogramas que ofrecen resultan muy simplificados.

2.7.1.3.2.1. DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA

Uno de los primeros detectores utilizados para el trabajo de rutina en cromatografía de gases, ha sido el detector de conductividad térmica o detector de hilo caliente. Este tipo de detector responde a la diferencia de conductividad térmica existente entre el gas portador puro y el gas portador mezclado con alguna otra sustancia, la magnitud de la respuesta dependerá de la diferencia de conductividad térmica entre el compuesto que eluye de la columna y el gas portador.

En un detector de conductividad, el gas procedente de la columna pasa a través de una cavidad termostatazada que contiene el elemento sensor, un hilo de metal calentado o un termistor.

Cuando pasa a través del detector el gas portador puro, la pérdida de calor de sensor es función de la diferencia de temperatura entre éste gas y la pared de la cavidad y de la conductividad térmica del gas portador, cuando eluye una sustancia mezclada con el gas portador, la conductividad térmica varía, y como consecuencia se produce un cambio de temperatura en el sensor; el cambio de temperatura, se traduce en una variación de una señal eléctrica (resistencia o voltaje según sea el elemento sensor), que es convenientemente amplificada y registrada.

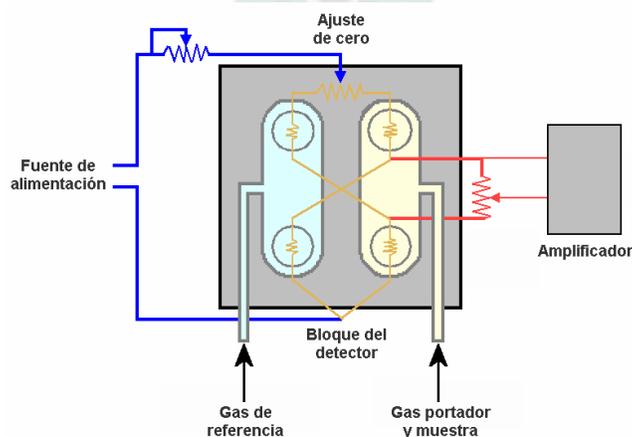


Figura 11. Esquema de un detector de conductividad térmica

Un esquema de un detector típico de conductividad térmica se encuentra en la figura 11.

El detector de conductividad térmica es universal y no destructivo, por lo general se utiliza para el análisis de gases permanentes, hidrocarburos ligeros y otros tipos de compuestos que ofrecen una respuesta pobre en otro tipo de detectores.

Su sensibilidad oscila entre 10^{-6} y 10^{-8} g, con un rango dinámico lineal de aproximadamente de cuatro órdenes de magnitud.

2.7.1.3.2.2. DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)

El detector de ionización de llama, es más ampliamente utilizado en cromatografía de gases. Este tipo de detector es en la práctica de respuesta universal, ya que es selectivo hacia los compuestos que presenten enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en el.

En un detector de ionización de llama, el gas procedente de la columna se mezcla con hidrógeno y esta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire. Por encima de la llama, se dispone un colector cilíndrico polarizado con el fin de recoger los iones generados; sobre este dispositivo, se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador y el electrodo colector. El esquema de un detector de ionización de llama se encuentra en la figura 12.

El mecanismo de generación de iones en este detector es complejo y no del todo conocido, ya que la energía de la llama es demasiado baja para explicar la generación de iones; generalmente, se cree que estos son generados por medio de un proceso de ionización química, en el que la energía liberada por reacciones fuertemente exotérmicas es retenida por las moléculas orgánicas, generándose iones a partir de las moléculas excitadas.

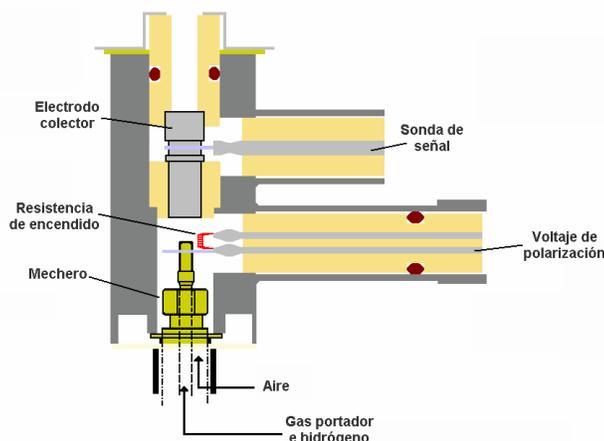


Figura 12. Sección de un detector de ionización de llama

El detector de ionización de llama se polariza siempre con un voltaje de saturación; bajo estas condiciones, la corriente de fondo es del orden de $10^{-13} - 10^{-14}$ A, que se incrementa hasta un nivel de $10^{-12} - 10^{-9}$ A en presencia de un vapor orgánico.

Los detectores de ionización de llama ofrecen una elevada sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente elevado, junto con una gran sencillez de utilización ha hecho que este tipo de detectores, sean mucho más utilizados.

2.7.1.3.2.3. DETECTOR DE CAPTURA ELECTRÓNICA

El detector de captura electrónica ocupa el segundo lugar entre los detectores de más alta utilización, debido a su sensibilidad (el detector de captura electrónica es probablemente el dispositivo analítico más sensible que se conoce). Este hecho junto a su selectividad hacia compuestos de enorme interés, fundamentalmente en áreas de medio ambiente y toxicología, hacen que sea enormemente utilizado para la detección y cuantificación de trazas.

En un detector de captura electrónica (Figura 13), se utiliza una fuente de radiación β^- para bombardear el gas que pasa a través de una cámara de ionización, generándose de esta forma un plasma de iones positivos, radicales libres y electrones térmicos.

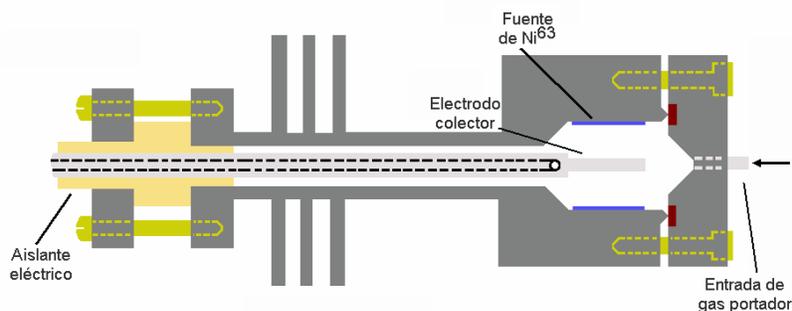


Figura 13. Detector de captura electrónica de tipo concéntrico

En un término medio, cada partícula β puede producir entre 100 y 1 000 electrones térmicos con un rango de energías de entre 0.02 y 0.05 eV; la aplicación de un potencial a la célula del detector de captura, permite que los electrones térmicos sean recogidos en un

electrodo colector, estableciéndose de esta forma una corriente de fondo, en presencia de gas portador puro, que da lugar a la línea base del detector, cuando un compuesto activo frente a este detector, penetra junto con el gas portador en la célula de medida, puede capturar los electrones térmicos para bien iones negativos de menor movilidad que los electrones, o bien fragmento neutros por recombinación con los iones positivos del plasma generado en el proceso primario, este proceso de captura origina una disminución de la corriente de fondo del detector, que puede relacionarse de forma cuantitativa con la cantidad de analito que está pasando a través del detector.

Las fuentes de partículas β utilizadas en este tipo de detectores son emisores débiles de ^3H , ^{63}Ni , ^{55}Fe , o electrones emitidos por efecto termoeléctrico, aunque en la práctica solamente

son asequibles detectores basados en fuentes de ^{63}Ni y en algunos casos de tritio. Como gases portadores, el detector de captura electrónica puede utilizar únicamente hidrógeno, gases nobles o nitrógeno, libres o niveles extremadamente bajos trazas de oxígeno y vapor de agua.

El detector de captura electrónica, responde de forma muy selectiva frente a compuestos que presentan grupos con elevada afinidad electrónica, en particular halógenos y grupos nitro, ofreciendo frente a este tipo de compuestos una respuesta $10^6 - 10^7$ veces superior frente a los hidrocarburos.

Este detector ofrece unas características muy buenas tanto por su sensibilidad como por su especificidad, el manejo de estos detectores no es sencillo, ya que su respuesta puede ser muy variable en función de las condiciones experimentales (potencial de polarización, temperatura, caudal del gas portador, etc.), viéndose afectadas no solo su sensibilidad sino también su selectividad y su rango dinámico lineal, que en ocasiones puede quedar muy reducido, a estas dificultades se añade la sensibilidad hacia cualquier tipo de contaminación y la gran dificultad que representa su limpieza, por lo que se debe tomar mayores precauciones.

2.7.1.3.2.4. DETECTOR DE NITRÓGENO – FÓSFORO

El detector de nitrógeno-fósforo también es conocido como detector termoiónico o detector de llama alcalina, está basado en el hecho de que la adición de una sal de metales alcalinos a la llama de un detector de ionización aumenta la respuesta de este hacia determinados elementos como fósforo, nitrógeno, azufre, etc. La selectividad de este tipo de detectores es muy dependiente de parámetros tales como la temperatura, la forma y el tamaño de la llama, la composición de la sal alcalina, geometría del detector, etc, debido a esta dependencia de muchos parámetros experimentales, el manejo de este tipo de detector es difícil, la optimización de la respuesta es tediosa y su estabilidad, debido a pérdidas por vaporización de la sal alcalina, es muy escasa. Parte de los problemas mencionados, han

sido solucionados en muchos detectores comerciales en base a sustituir la perla de la sal alcalina del detector por un vidrio o una cerámica alcalina calentada eléctricamente de forma independiente.

En un detector de este tipo (figura 14), una perla de un silicato de metal alcalino, calentada eléctricamente, se coloca entre el “jet” del detector y el electrodo colector, manteniéndose la perla aun potencial negativo para reducir las pérdidas del metal alcalino.

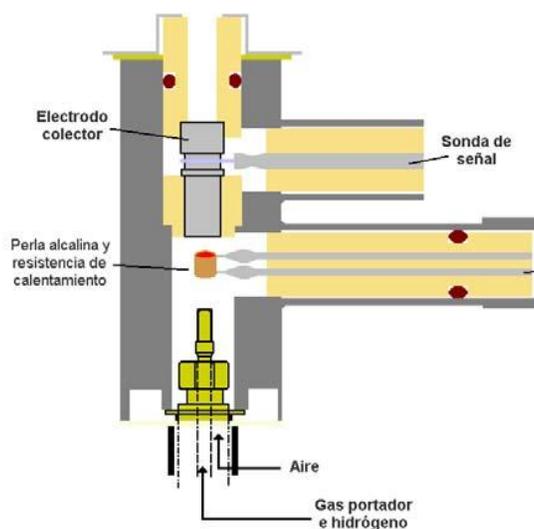


Figura 14. Detector de nitrógeno-fósforo

En la región de la perla se genera un plasma por medio de una mezcla de aire/hidrógeno, utilizándose un flujo de hidrógeno muy bajo normalmente entre 1 – 5 mL / min, insuficiente para mantener una llama pero suficiente para mantener un plasma en el que puedan darse los fenómenos de una ionización.

El detector de nitrógeno-fósforo ofrece una sensibilidad de aproximadamente 10^{-13} g/s de nitrógeno y 5×10^{-14} g/s de fósforo, con una especificidad de 10^4 sobre compuestos que no presenten estos átomos y su rango dinámico oscila entre 10^4 y 10^5 . El detector NPD es muy utilizado en el cambio de medio ambiente, fundamentalmente para la determinación de

residuos de plaguicidas, debido a su sensibilidad y a su especificidad, lo que permite minimizar la limpieza de las muestras.

El principal problema que presenta este detector es la inestabilidad de su respuesta, debida fundamentalmente a contaminación o pérdida de la actividad de la perla alcalina, por lo que es necesario realizar calibraciones con relativa frecuencia.

2.7.1.3.2.5. DETECTOR FOTOMÉTRICO DE LLAMA

El detector fotométrico de llama (FPD), utiliza una llama de hidrógeno para excitar a un estado electrónico elevado de fragmentos de moléculas que contengan átomos de azufre o fósforo.

Estos dos elementos son excitados de forma óptima por la llama de hidrógeno y cuando retornan a su estado fundamental emiten las líneas características de sus espectros; las líneas analíticas de interés son seleccionadas por medio de un filtro (392 nm para determinar azufre y 526 nm para fósforo) y la intensidad de la radiación emitida es medida por medio de un fotomultiplicador, figura 15.

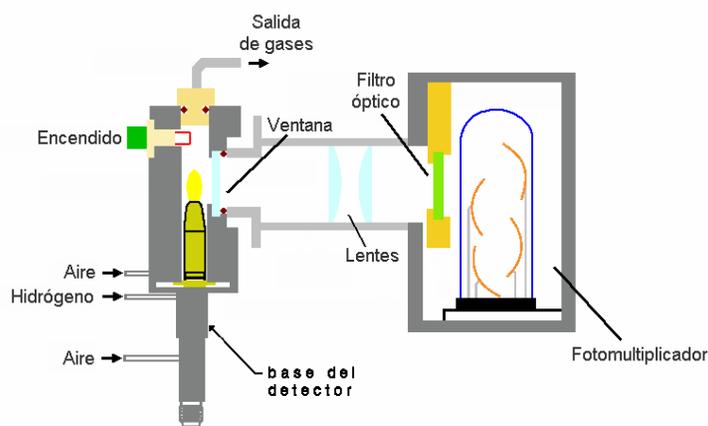


Figura 15, Esquema de un detector fotométrico de llama

En este tipo de detector, el gas portador procedente de la columna es mezclado con naire y quemado en una atmósfera de hidrógeno; la emisión de los átomos de azufre o fósforo se da fundamentalmente en la zona superior, rica en hidrógeno de la llama, por lo que en

ocasiones se utiliza un diseño de doble quemador (figura 16) con una segunda llama para producir excitación. Este diseño ayuda además a evitar el fenómeno de apagado de llama, que se da en este tipo de detectores, cuando eluye de la columna un compuesto en gran cantidad, básicamente el disolvente de inyección.

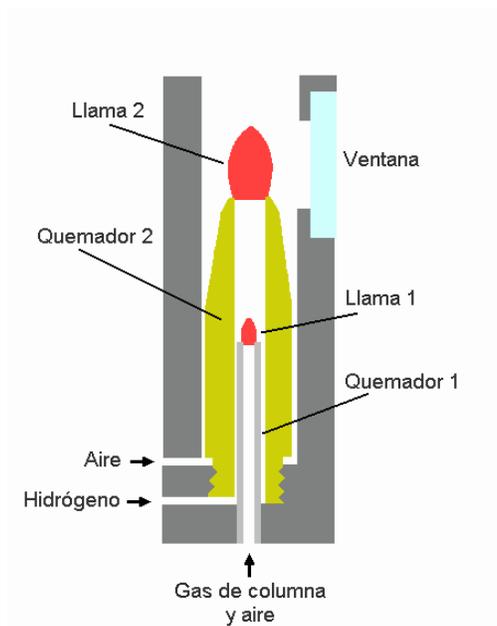


Figura 16. Detalle de un doble quemador

La sensibilidad y la selectividad de este tipo de detectores son variables, dependiendo de su diseño y de las condiciones de trabajo, un valor de sensibilidad típico es 10^{-13} g/s para fósforo y 10^{-12} g/s para azufre, con un rango dinámico lineal de aproximadamente 1 .000. La selectividad de estos detectores oscila entre los valores de 5×10^5 para el caso del fósforo y 10^3 para el azufre.

2.7.1.3.2.6. DETECTOR DE FOTOIONIZACIÓN

Los detectores de fotoionización están basados en la utilización de los fotones generados en una lámpara de descarga para ionizar los compuestos orgánicos que emergen, junto con el gas portador, de una columna cromatográfica.

Este tipo de detectores, utilizan para generar la radiación, un tubo de descarga que contiene una mezcla de gases a baja presión; estos son excitados por medio de una diferencia de potencial elevada que se mantiene entre los dos electrodos. La variación en las proporciones de la mezcla de gases de la lámpara, permite obtener radiación ultravioleta de diferentes energías aunque la más utilizada es la lámpara de 10.2 Ev.

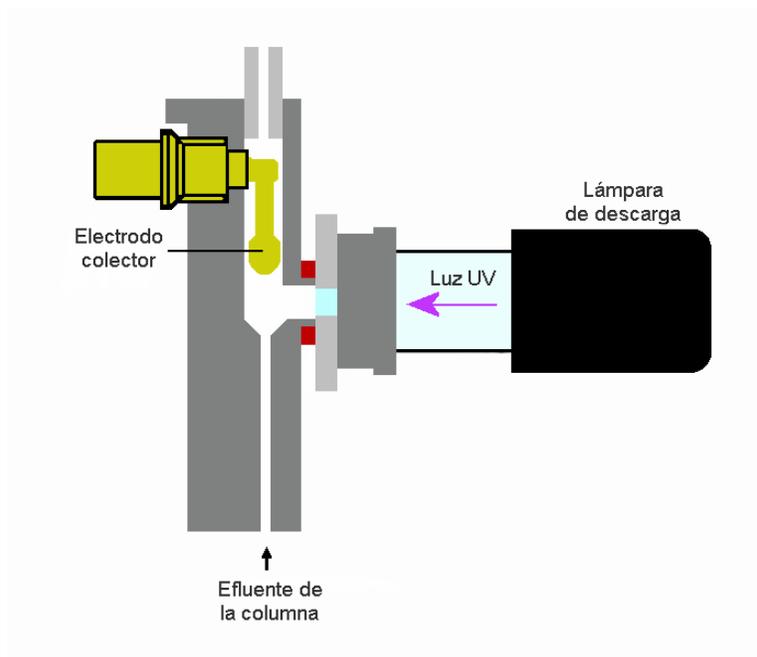


Figura 17. Detector de fotoionización

Este detector (Figura 17), el gas portador pasa a través de una cámara de ionización, separada físicamente del tubo de descarga por medio de una ventana transparente a la radiación, utilizada generalmente el MgF_2 . Los compuestos que eluyen de la columna son ionizados por los fotones de alta energía procedentes de la lámpara y los iones generados son recogidos por medio de un electrodo polarizado adecuadamente. Prácticamente la totalidad de los compuestos orgánicos dan algún tipo de respuesta con estos detectores.

La sensibilidad del detector de fotoionización es dependiente del potencial de ionización del compuesto que se trate, la respuesta del detector frente a los compuestos orgánicos sigue el orden general:

aromáticos> alquenos>alcanos>alcoholes>ésteres>aldehídos>cetonas

En general el detector de fotoionización es entre 5-10 veces más sensible que el detector de ionización de llama frente a los alcanos, y del orden 35 veces más sensible frente a los hidrocarburos aromáticos, su rango dinámico lineal es, por término medio, de cuatro órdenes de magnitud.

2.7.1.3.2.7. DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD ELECTROLÍTICA

La utilización del detector de conductividad, está basada en la medida de las variaciones de la conductividad que presenta una disolución de electrolitos; estos electrolitos se forman por disolución en agua de los productos de las sustancias eluidas, solo las sustancias que contengan grupos capaces de comportarse como electrolitos serán detectable por este medio.

La descomposición de las sustancias eluidas se lleva a cabo por medio de pirolisis o de reacciones catalizadas en un horno de flujo de bajo volumen, formado normalmente por un tubo de níquel o cuarzo de pequeño diámetro mantenido a una temperatura de 500 a 1 000 °C.

Las reacciones catalizadas de oxidación o reducción, se realizan mezclando el gas portador con oxígeno, aire o hidrógeno a la salida de la columna y haciendo pasar esta mezcla por un catalizador, que generalmente es un hilo de níquel contenido dentro del tubo reactor, en ocasiones a la salida del horno de pirolisis se sitúa un filtro químico con el objeto de retener de forma selectiva alguno de los productos de pirolisis y a su vez aumentar la selectividad del detector.

El esquema de un detector de conductividad se encuentra en la figura 18.

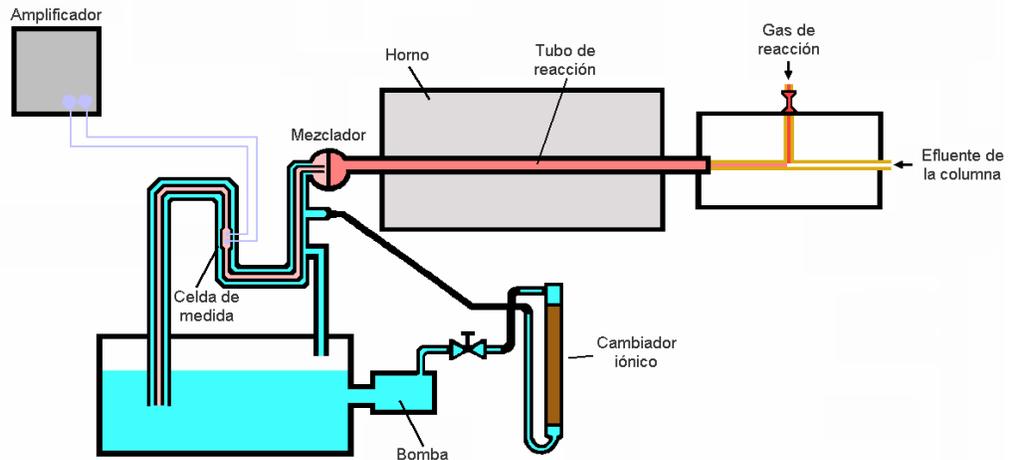


Figura 18. Diagrama de funcionamiento de un detector de conductividad

El detector de conductividad electrolítica más ampliamente utilizada es el de Hall; la célula de medida de este detector (Figura 19), mide la conductividad del líquido en su primera parte y la conductividad del líquido más la de los productos de pirólisis en la segunda, sumándose después de forma diferencial las señales de las dos medidas, con lo que se minimizan las fluctuaciones de respuesta debido a factores que puedan afectar a la medida de conductividad de base del líquido, variaciones de temperatura, etc.

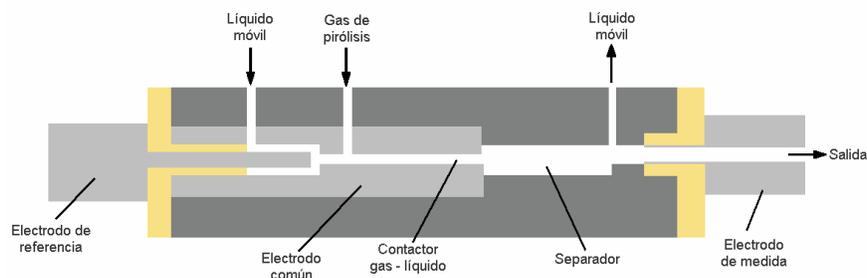


Figura 19. Esquema de la célula de conductividad de un detector Hall

Los líquidos de base utilizados de estos en estos detectores están formados normalmente por alcoholes como metanol, isopropanol, etc, solo o mezclados con agua; la utilización de este tipo de disolventes en lugar de agua permite mejorar notablemente la sensibilidad, la selectividad y el rango dinámico lineal del detector.

Los detectores de conductividad ofrecen buena sensibilidad entre 10^{-12} y 10^{-13} g/s del elemento con el que se esté trabajando, una buena selectividad entre 10^4 y 10^9 según los elementos y un rango dinámico lineal que oscila entre 10^3 y 10^5 . La utilización de este tipo de detectores no es fácil, ya que cualquier tipo de contaminación, un catalizador desactivado, un filtro químico agotado, etc. se traducen con mucha facilidad en deformaciones de los picos, ruido elevado y falta de linealidad en la respuesta. Las características de algunos detectores se detalla en la tabla N° 5.

Detector	Límite de detección g	Rango lineal	Comentarios	Tratamiento soluto
TCD	10^{-5} - 10^{-6}	10^3 - 10^4	Detector universal	No destructivo
FID	10^{-12}	10^6 - 10^7	Detector universal	Destructivo
ECD	10^{-14}	10^2 - 10^3	Detector selectivo	No destructivo
FPD	10^{-13}	10^2	Detector Selectivo S,P	Destructivo
NPD	10^{-8} - 10^{-14}	10^5 - 10^7	Detector Selectivo N,P	Destructivo
MSD	10^{-12}	Según tipo detector	Detector universal	Destructivo

Tabla N° 5 - Características de los detectores

2.8. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO

Aparte de la elección de la columna a utilizar, existen muy pocos parámetros experimentales sobre los que pueda influir a la hora de realizar una separación y normalmente, su optimización resulta muy sencilla. Básicamente los parámetros a fijar en cada caso es:

- Naturaleza y velocidad del gas portador
- Temperatura del detector
- Temperatura del inyector
- Temperatura de la columna

El gas portador es básicamente inerte en la separación, por lo que la elección de uno u otro dependerá en cada caso de las necesidades del equipo y de forma secundaria, de las necesidades de rapidez del análisis.

Como norma general, en todos los casos debe trabajarse, con la velocidad lineal de gas que corresponda al mínimo de la curva de AEPT, aunque en el caso de separaciones que no requieran grandes eficacias de columna puede aumentarse la velocidad para acortar el tiempo de análisis a expensas de reducir la eficacia.

La temperatura del detector, aunque en algunos tipos de detectores puede influir sobre la respuesta, no es normalmente un parámetro que requiera una optimización excesiva. La temperatura del detector debe ser siempre más elevada que la máxima temperatura de trabajo a que se someta la columna, con el fin de evitar que se puedan condensar en el detector compuestos eluidos de baja volatilidad.

La temperatura de inyección no suele ser tampoco un parámetro difícil de optimizar, en general, debe ser lo suficientemente elevada como para volatilizar completamente todos los

componentes de la muestra, no debiéndose elevar más allá de este nivel para evitar posibles descomposiciones térmicas de la muestra.

La temperatura de la columna, si se trabaja en condiciones isotérmicas, o en su programa de calentamiento son los únicos parámetros instrumentales que pueden tener una influencia decisiva en la separación.

En condiciones de trabajo isotérmicos, los picos de trabajo que aparecen a pequeños volúmenes de retención se encuentran con frecuencia mal resueltos, mientras los que presentan volúmenes de retención elevados, aunque bien resueltos, a parecen a tiempos muy largos y presentan además un ensanchamiento considerable (Figura - 22); es evidente, por lo tanto, que la temperatura de la columna debe elegirse de forma que los componentes de interés de la mezcla aparezcan con volúmenes de retención medios, aún acosta de dejar retenidos en la columna los componentes que presenten mayores tiempos de retención (Figura - 23). En estos casos, basta con realizar dos o tres inyecciones de prueba para determinar una temperatura de trabajo adecuada.

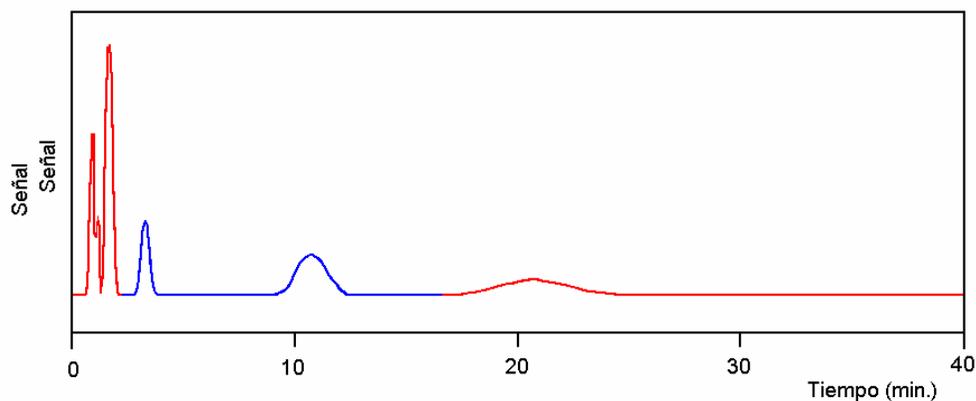


Figura 22. Cromatograma de una mezcla en condiciones isotermas

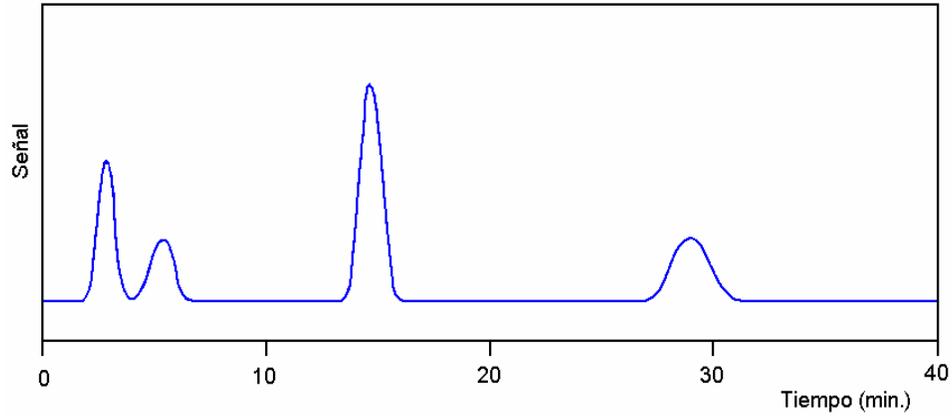


Figura 23. Condiciones isotermas adecuadas a los compuestos de interés

En muestras complejas y con componentes que presentan volúmenes de retención muy diferentes, es muy conveniente recurrir a técnicas de programación de temperatura (Figura - 24) es decir, incrementar la temperatura de la columna según un programa de calentamiento previamente establecido de temperatura en función al tiempo.

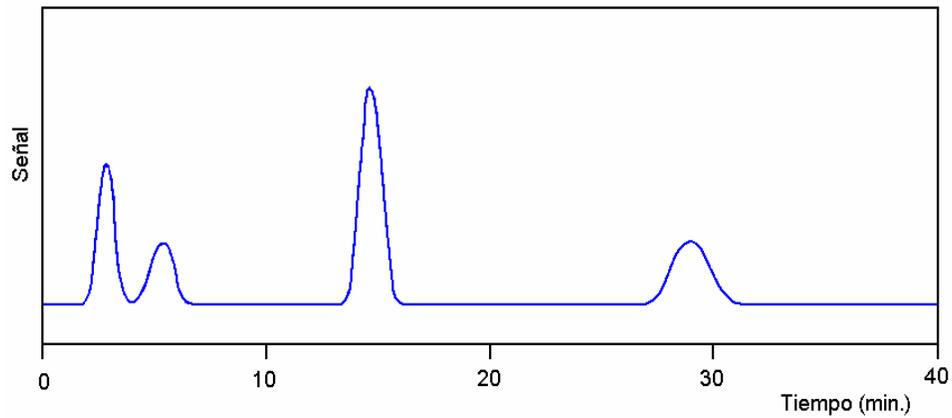


Figura 23. Condiciones isotermas adecuadas a los compuestos de interés

En estos casos, resulta muy conveniente realizar una prueba previa con una velocidad de calentamiento relativamente elevada y cubriendo un rango de temperaturas muy amplio, con el fin de estimar la temperatura a la que eluye cada componente y la resolución que

presentan los picos; a la vista de los resultados obtenidos, se podrá fijar mayor precisión el intervalo de a utilizar, así como la velocidad de calentamiento, teniendo en cuenta que la mayor separación entre los componentes se obtiene siempre con velocidades de calentamiento muy pequeñas.





CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

- Matraz aforado de 100 mL
- Pipeta graduada de 1 mL
- Columna de fraccionamiento vigreux
- Balón de destilación de dos bocas de 250 mL
- Balón de destilación de 250 mL
- Colector graduado
- Probeta 100 mL
- Pinzas de tres dedos más nuez
- Cabeza de destilación
- Manguerillas
- Probeta 100 mL
- Pizeta
- Cepillo
- Termómetro de 100 °C
- Manto calefactor

3.2.- EQUIPOS

- Cromatógrafo de gas marca Shimadzu Modelo 2014.
Con detector FID
- Columna Rtx serial 1007225 (60mx 0.53mmx 0.5µm).
- Inyector automático
- Viales de 2 y 4mL.
- Micropipeta de 200µL.
- Alcoholímetro

3.3.- REACTIVOS

- Metanol al 100% grado cromatográfico.
- Agua destilada de pureza cromatográfica
- Muestra de Son de Cuba.
- Muestra de Boca Chica
- Muestra de New Style
- Gas Helio
- Gas Hidrógeno

3.4.- MÉTODOS

Cromatografía de gas para la identificación y cuantificación de metanol en bebidas alcohólicas de mayor consumo, el análisis de las muestras se realizó por triplicado.

3.4.1.- PROCEDIMIENTO

Este estudio es realizado en tres marcas de bebidas alcohólicas, generalmente de mayor consumo y costo bajo; estas bebidas analizadas son: Son de Cuba, Boca Chica y New Style todas posicionadas en el mercado de La Paz, las dos primeras son productos nacionales y la tercera es un producto argentino. Las muestras se tomaron en los principales puntos de comercialización de estos productos como son las licorerías. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Cromatografía de la Carrera de Química Industrial de la Facultad de Tecnología.

El muestreo realizado fue al azar y por triplicado en cada punto de comercialización para cada marca de bebida alcohólica.

El componente principal a analizar es el metanol, la presencia y cuantificación de este, a su vez se determinará principalmente las condiciones de trabajo en el equipo para identificar este componente en cualquier bebida alcohólica previo tratamiento de la muestra.

También se determinará el grado alcohólico de estos productos.

3.4.1.1. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES – CURVA DE CALIBRACIÓN

Los estándares utilizados para la realización de la curva de calibración fueron de grado cromatográfico.

Se prepararon las siguientes disoluciones de metanol para determinar los tiempos de retención y sus respectivas áreas en los cromatogramas.

Preparación de Estándar de metanol de 200 ppm

- Medir con una micropipeta 12.6 μ L de metanol grado cromatográfico.
- Verter en un aforado de 50 mL
- Aforar con agua destilada grado cromatográfico.
- Agitar y homogenizar

Cálculo del volumen de metanol para 200 ppm:

$$50 \text{ mL} \times \frac{200 \text{ mg CH}_3\text{OH}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ g CH}_3\text{OH}}{1000 \text{ mg CH}_3\text{OH}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.792 \text{ g CH}_3\text{OH}} = 12.6 \mu\text{L}$$

Preparación de Estándar de metanol de 300 ppm

- Medir con una micropipeta 18.9 μL de metanol grado cromatográfico.
- Verter en un aforado de 50 mL
- Aforar con agua destilada grado cromatográfico.
- Agitar y homogenizar

Cálculo del volumen de metanol para 300 ppm:

$$50 \text{ mL} \times \frac{300 \text{ mg CH}_3\text{OH}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ g CH}_3\text{OH}}{1000 \text{ mg CH}_3\text{OH}} \times \frac{1 \text{ mL CH}_3\text{OH}}{0.792 \text{ g CH}_3\text{OH}} = 18.9 \mu\text{L}$$

Preparación de Estándar de metanol de 400 ppm

- Medir con una micropipeta 25.2 μL de metanol grado cromatográfico.
- Verter en un aforado de 50 mL
- Aforar con agua destilada grado cromatográfico
- Agitar y homogenizar.

Cálculo del volumen de metanol para 400 ppm:

$$50 \text{ mL} \times \frac{400 \text{ mg CH}_3\text{OH}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ g CH}_3\text{OH}}{1000 \text{ mg CH}_3\text{OH}} \times \frac{1 \text{ mL CH}_3\text{OH}}{0.792 \text{ g CH}_3\text{OH}} = 25.2 \mu\text{L}$$

3.4.1.2. MUESTRA

3.4.1.2.1. DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO

- Llenar en una probeta de 100 mL la muestra alcohólica.
- Sumergir el alcoholímetro.
- Leer el grado alcohólico

Nota.- Las bebidas azucaradas deben pasar por un proceso de destilación, ya que este tipo de bebidas no permiten que el alcoholímetro se sumerja.

3.4.1.2.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La muestra para ser analizada por cromatografía de gas requiere un tratamiento previo, el cual se indica a continuación:

- Medir 100 mL de muestra.
- Colocar en un balón de destilación.
- Armar el sistema de destilación mostrado en la fotografía N° 1.
- Recolectar 10 ml de destilado controlando la temperatura y aforar a 100 mL.
- Realizar el análisis correspondiente.



Fotografía N° 1

3.4.1.3. LECTURA POR CROMATOGRAFÍA DE GAS

3.4.1.3.1. AJUSTE DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para la determinación de metanol se utilizó un cromatógrafo de gases de marca Shimatzu (Fotografía N° 2), estableciéndose el método de análisis siguiente en el software del equipo:



Foto N° 2. Cromatógrafo de gases de marca Shimatzu

Temperatura del inyector: 210 °C

Modo Split

Relación 5:1

Temperatura de la columna: 60 °C incrementando hasta 120, a una tasa ascendente de 20 °C/min.

Columna capilar (60 m de largo x 0.53mm ID x 0.5 μ m), con un flujo constante de 30mL/min de helio.

Temperatura del detector FID: 210 °C

El tiempo total de análisis (tiempo de corrido) fue de 5 minutos utilizando Helio como gas transportador (gas carry).

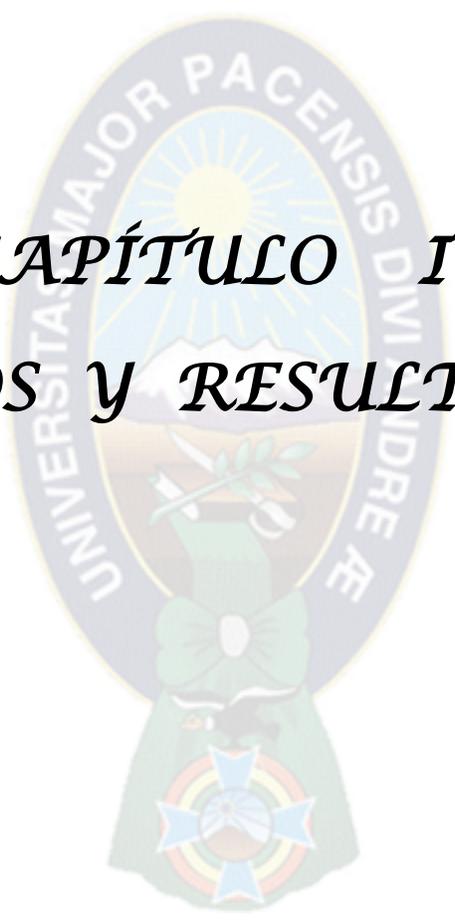
3.4.1.3.2. LECTURA DE ESTÁNDARES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Se determinará y cuantificará la presencia de metanol en bebidas alcohólicas, bajo un estudio que relaciona el área y el tiempo de retención de dicho alcohol.

3.4.1.3.3. LECTURA DE LA MUESTRA

La presencia de metanol en las muestras es realizada bajo las mismas condiciones que los estándares, determinándose el área y el tiempo de retención para cada bebida alcohólica.

Para la determinación de metanol el análisis cuantitativo determinando los tiempos de retención tanto de las soluciones patrón como de las muestras, para la cuantificación se utilizará en método del patrón externo, que consiste en preparar soluciones patrón, medir sus áreas respectivamente, luego graficar la curva de calibración y finalmente determinar la concentración metanol en las muestras.



CAPÍTULO IV
DATOS Y RESULTADOS

4.1.- DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO

Los resultados de la medida del grado alcohólico de las diferentes muestras se resumen en la tabla N°6:

N°	MUESTRAS	GRADO ALCOHÓLICO °GL (ETIQUETA)	GRADO ALCOHÓLICO °GL (LEIDO)
1	Son de Cuba-1	9	3
	Son de Cuba-2	9	5
	Son de Cuba-3	9	4
2	Boca Chica-1	37	28
	Boca Chica-2	37	29
	Boca Chica-3	37	30
3	New Style – 1	34	20
	New Style – 2	34	22
	New Style - 3	34	18

Tabla N° 6. Medida del grado alcohólico de las diferentes muestras

4.2. DETERMINACIÓN DEL ÁREA Y TIEMPO DE RETENCIÓN DE LOS ESTÁNDARES

El área y tiempo de retención de los estándares es determinado por el software y el programa de equipo de cromatografía de gas.

El tiempo de retención del estándar de 200 ppm en el Cromatógrafo de Gas fue de 1.6 minutos (Anexo - 1).

El tiempo de retención del estándar de 300 ppm en el Cromatógrafo de Gas fue de 1.6 minutos (Anexo-2)

El tiempo de retención del estándar de 400 ppm en el Cromatógrafo de Gas fue de 1.6 minutos (Anexo-3)

Los datos citados en la parte superior son resumidos en la tabla N° 7 :

N°	ESTANDAR (ppm)	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA
1	200	1.6	20516
2	300	1.6	60539
3	400	1.6	123689

Tabla N° 7

4.3. LECTURA DE ÁREA Y TIEMPO DE RETENCIÓN DE LAS MUESTRAS

El área y tiempo de retención de las muestras son determinadas por el software y el programa de equipo de cromatografía de gas.

En la tabla 8 se detalla las áreas y tiempos de retención leídos por el software del equipo, para las muestras analizadas y los cromatogramas se encuentran en los anexos 4-12.

Nº	MUESTRA	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA
		(min)	
1	Son de Cuba-1	1.633	7754
2	Son de Cuba-1	1.631	9364
3	Son de Cuba-1	1.633	5187
4	Boca Chica-1	1.626	44053
5	Boca Chica-2	1.630	23183
6	Boca Chica-3	1.631	13986
7	New Style – 1	1.626	92809
8	New Style – 2	1.637	48805
9	New Style - 3	1.628	89993

Tabla N° 8. Tiempos de retención y áreas de las muestras analizadas

CURVA DE CALIBRACIÓN

Con los datos de concentración y el área de las soluciones patrón se grafica la curva de calibración representado en el gráfico N° 14.

CONCENTRACION vs ÁREA

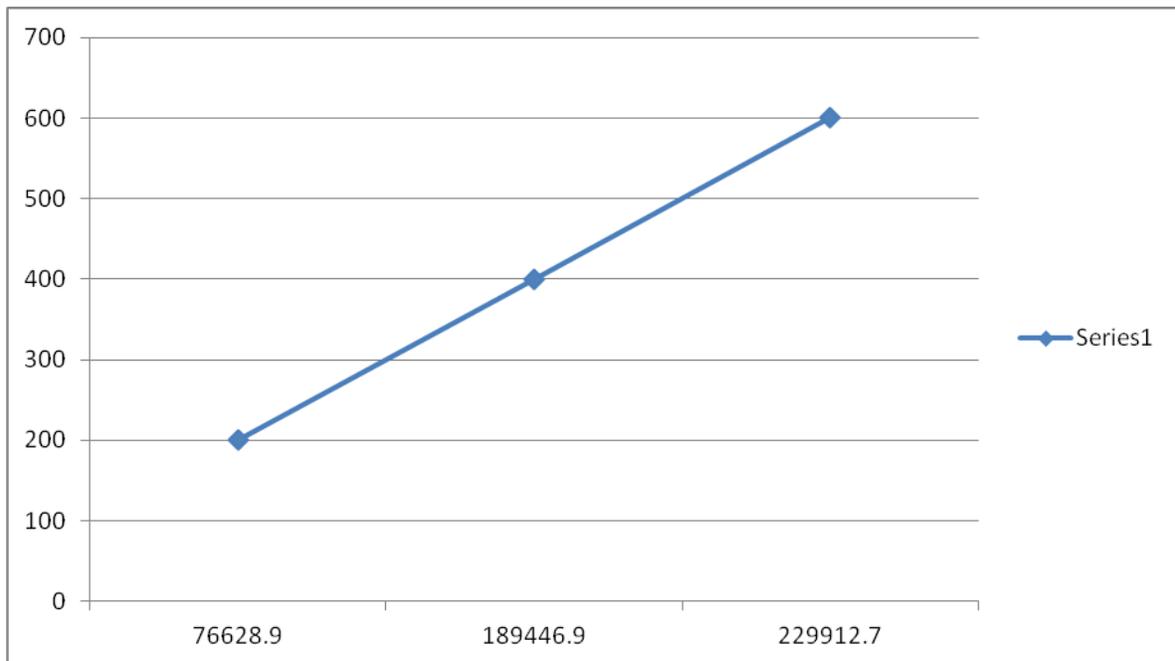


Gráfico N° 14

Realizando el ajuste de la curva se obtiene la ecuación:

$$y = ax + b$$

Donde:

$$a = 1.90656 \times 10^{-3}$$

$$b = 169.8806$$

$$R = 0.99917289$$

Entonces la ecuación (1) se transformará en:

$$y = 1.90656 \times 10^{-3} x + 169.8806$$

y = concentración en ppm

x = área de la muestra

N°	MUESTRA	CONCENTRACIÓN	ÁREA
		[ppm]	
1	Son de Cuba-1	184.66	7754
2	Son de Cuba-1	171.66	9364
3	Son de Cuba-1	179.76	5187
4	Boca Chica-1	253.87	44053
5	Boca Chica-2	214.08	23183
6	Boca Chica-3	196.545	13986
7	New Style – 1	364.82	92809
8	New Style – 2	269.93	48805
9	New Style - 3	341.56	89993

Tabla N° 9. Concentraciones de las muestras de acuerdo al ajuste de curva

Se realizó una dilución 5 x por lo tanto la concentración de metanol en la muestra será:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad \rightarrow \quad C_1 = C_2 V_2 / V_1$$

$$C_1 = C_2 \cdot 25 / 5$$

N°	MUESTRA	C ₂	C ₁
		[ppm]	
1	Son de Cuba-1	184.66	923.3
2	Son de Cuba-1	171.66	858.3
3	Son de Cuba-1	179.76	898.8
4	Boca Chica-1	253.87	1269.35
5	Boca Chica-2	214.08	1070.4
6	Boca Chica-3	196.545	982.72
7	New Style – 1	364.82	1734.1
8	New Style – 2	269.93	1349.65
9	New Style - 3	341.56	1707.8

Tabla N° 10. Concentraciones de las muestras



CAPÍTULO V
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal desarrollar un método que permita determinar y cuantificar la presencia de metanol en bebidas alcohólicas usando el cromatógrafo de gases marca Shimadzu, para lo cual se determinó las siguientes condiciones de trabajo:

Temperatura del inyector: 210 °C

Modo Split

Relación 5:1

Temperatura de la columna: 60 °C incrementando hasta 120, a una tasa ascendente de 20 °C/min.

Columna capilar (60 m de largo x 0.53mm ID x 0.5 µm), con un flujo constante de 30mL/min de helio.

Temperatura del detector FID: 210 °C.

Se determinó también el grado alcohólico de las tres muestras los cuales no concuerdan con los datos de la etiqueta.

La investigación fue realizada tomando muestras al azar de los diferentes puntos de comercialización de la ciudad de La Paz.

Los tiempos de retención del metanol tanto de los estándares, como en las muestras según los resultados y considerando un decimal es de 1.6. Por lo que se puede asegurar que todos los tiempos de retención corresponden al metanol por la semejanza entre el tiempo de retención del estándar y las muestras analizadas bajo las mismas condiciones ambientales y de trabajo en el equipo.

Según los resultados obtenidos, en todas las bebidas se verificó la presencia de metanol, esta contaminación se debe, principalmente a un proceso de fermentación inadecuado, donde se facilita la formación de metanol por la desesterificación de las pectinas estearasas presentes en las frutas y en muchos casos se deba a la alteración del producto.





CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

Los valores de grado alcohólico registrados en la etiqueta de las bebidas alcohólicas no concordaron con los datos obtenidos con el alcoholímetro.

Se desarrolló el método de análisis en el cromatógrafo de gases que permitió determinar los tiempos de retención y áreas para metanol.

El metanol se encontró presente como contaminante en las tres bebidas alcohólicas: Son de Cuba, Boca Rica y New Style.

La concentración de metanol que fue cuantificada en las tres bebidas analizadas no sobrepasa el límite aceptado para este tipo de bebidas, sin embargo su presencia es un indicador de malas prácticas de manufactura y/o de adulteración de bebidas alcohólicas.

6.2. RECOMENDACIONES

Realizar una alianza con las entidades pertinentes para poder realizar un análisis a nivel local y nacional, con la cantidad de muestras necesarias, que asegure que las bebidas alcohólicas que se expendan en mercado cumplan con los requisitos de salud requeridos.

Destinar más recursos económicos para realizar un estudio más amplio y revisar las regulaciones nacionales para ver si concuerdan con los estándares internacionales de calidad de bebidas alcohólicas.

Desarrollar nuevos métodos, para determinar la presencia de alcoholes superiores y otros componentes en las bebidas

BIBLIOGRAFÍA



1. Enciclopedia Larouse Tomo I. 1999. Editorial Larouse. 10ª. Edición. Barcelona, España.
2. Katzung, Bernad. 2000. Farmacología Básica y Clínica. 8ªedición. Editorial El Manual Moderno. México.
3. Goodman Gilman. 2000 Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10 edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
4. The MerckIndex.13ª.Edición.MerckCo.Inc.Rahway,NJ, USA.1983.1463 p (853)
5. Enciclopedia Encarta Microsoft 2000. 1993. Microsoft Corporation. Estados Unidos de América.
6. Raymond, Chang.1998. Química. Editorial McGraw Hill. 6ta. Edición.
7. Documento Técnico. Evaluación de Riesgos: Bebidas Alcohólicas Artesanales. Ministerio de Salud. Perú. 2001. 87p.
8. Intoxicación y Acidosis Metabólica producida por Metanol. 2002. Estados Unidos de América, Disponible en : www.intox.org/pagesource/treatment/spanish/acidosis_metabolica.htm
9. Klaassen, Curtis; Watkins, Jonh. Manual de Toxicología. 5ª. Edición. Editorial McGraw-Hill. Mexico. (p. 471,587,744-745)
10. Norma Oficial Mexicana NOM-053-SSA1-1993. Medidas Sanitarias del Proceso y Uso del Metanol (Alcohol Metílico).Mexico.1993.
11. Uribe, C. Manual de Toxicología Clínica. Bogota, Colombia. Temis. P p85,86.
12. Córdoba, Darío. Toxicología. 4ª.Edición. Editorial Manual Moderno. p(393-398,473)
13. Jacobs, Morris. The Chemical Analysis of Foods and Food Products. 3rd. Edition. Roberte Krieger Publishing Co. Inc. United Status of America. 1980. 970p. p(246, 255).

14. Harris, Daniel. 1995. Análisis Químico Cuantitativo 3ª Edición. Editorial Iberoamericana. Estados Unidos.
15. Salas O. 2002. Identificación y Cuantificación de Metanol en Perfumes de Cinco Marcas Nacionales por Cromatografía de Gases. Guatemala. 56 p. (p.1-6,13,16-18).
16. Sandoval H. 1984. Determinación Cuantitativa por Cromatografía Gas-Líquido de los Alcoholes: Metanol, 1-Propanol, 2-Propanol, 1-Butanol, 2-Butanol, 3-Metil-1-Propanol, 2-Pentanol y 3-Metil-1-Butanol, que se encuentran presentes en Licores de Preparación Clandestina (Aguardientes). Guatemala. 31p. (p.3-4,7,12-14,26-27,29)
17. AARTOM. 2004. El Alcohol (en línea).
Disponible en : <http://www.aartom.tomelloso.es/>
18. Antonio, Luis, Miguel. 2003. Vinos y Enologías (en línea).
Disponible en: <http://www.apoloybaco.com/Aguardientes.htm>
19. Enciclopedia on line de prevención de riesgos laborales, SEGULAB. 2005. Ficha de seguridad, metanol (en línea).
Disponible en: <http://www.segulab.com/metanol.htm>
20. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos Cubano (INHA). 2000. Calidad de varios ronnes cubanos (en línea).
Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15_2_01/ali03201.htm



ANEXOS



ANEXO-1. Cromatograma estándar de metanol 200 ppm

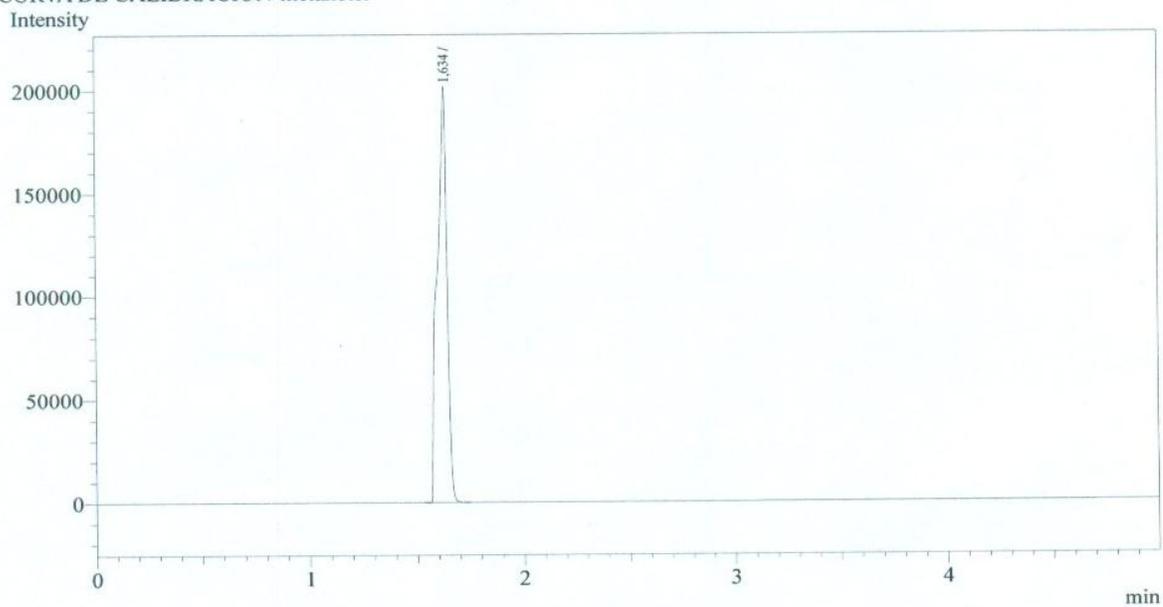


ANEXO-2. Cromatograma estándar de metanol 300 ppm

Analysis Date & Time : 10/11/2014 10:16:08
User Name : Admin
Vial# : 1
Sample Name : STD-METANOLSI-400-00
Sample ID : STD-METANOLSI-400-00
Sample Type : Standard
Injection Volume : 1,00
ISTD Amount :

Data Name : D:\GC\METANOL-400-00-00.gcd.gcd
Method Name : D:\GC\MET- Metanol-SI.gcm

[Description]
CURVA DE CALIBRACIÓN-metanolsi



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	1,634	631327	197545	0,000		S		
Total		631327	197545					

ANEXO-3. Cromatograma estándar de metanol 400 ppm



ANEXO-4. Cromatograma Son de Cuba - 1



ANEXO-5. Cromatograma Son de Cuba-2



ANEXO-6. Cromatograma Son de Cuba - 3



ANEXO-7. Cromatograma Boca Chica - 1



ANEXO-8. Cromatograma Boca Chica - 2



ANEXO-9. Cromatograma Boca Chica - 3



ANEXO-10. Cromatograma New Style - 1



ANEXO-11. Cromatograma New Style - 2



ANEXO-12. Cromatograma New Style - 3