



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA EN MUESTRAS DE ESPECIAS Y
GRANOS DE CAFÉ POR MEDIO DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA CON
ULTRASONIDO Y LA DETECCIÓN CON EL REACTIVO DE KARL FISCHER EN
LÍNEA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

THANIA SUSANA JIMÉNEZ MARTÍNEZ



TUTOR: Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macias

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en los laboratorios 105 y 106 del posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al CONACyT por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

A la Dra. María del Pilar Cañizarez Macias bajo cuya tutela se realizó este trabajo.

A mis compañeras del laboratorio.

A los miembros del jurado por sus comentarios.

Con cariño para mi papá, mi mamá, mi hermano y Pedro.

ÍNDICE

Índice.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	V
Resumen.....	1
Objetivos.....	3
1 FUNDAMENTO TEÓRICO	
1.1 Importancia de la determinación de agua y humedad.....	4
1.2 Especies.....	5
1.3 Granos de café.....	8
1.4 Métodos para la extracción y/o determinación de agua en alimentos.....	9
1.4.1 Métodos de secado.....	9
1.4.2 Métodos de destilación.....	11
1.4.3 Titulación con el reactivo de Karl Fischer.....	12
1.4.3.1 Extracción de agua.....	15
1.5 Análisis por inyección en flujo (FIA).....	16
1.5.1 Dispersión.....	19
1.6 Procesos de extracción.....	19
1.6.1 Ultrasonido.....	20
2 METODOLOGÍA	
2.1 Materiales y reactivos.....	25
2.1.1 Instrumentación.....	25
2.1.2 Reactivos.....	25
2.1.3 Preparación de disoluciones.....	26
2.1.4 Muestras analizadas.....	26
2.1.4.1 Especies.....	26
2.1.4.2 Café en grano.....	28
2.2 Procedimiento.....	28
2.2.1 Sistema de Inyección en Flujo (FIA) para la determinación del contenido de agua utilizando el reactivo de Karl Fischer.....	28
2.2.2 Precauciones con los reactivos.....	30
2.3 Métodos de extracción.....	30
2.3.1 Métodos de secado.....	30
2.3.1.1 Especies.....	30
2.3.1.2 Café en grano.....	31
2.3.2 Extracción con disolventes.....	32
2.3.2.1 Extracción con agitación magnética.....	33
2.3.2.2 Extracción por maceración.....	34
2.3.2.3 Extracción asistida con ultrasonido.....	34

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1	Espectro de absorción del reactivo de Karl Fischer (RKF).....	37
3.2	Sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).....	38
3.2.1	Límite de detección y de cuantificación.....	41
3.2.2	Evaluación del sistema FIA.....	42
3.2.2.1	Repetibilidad y reproducibilidad.....	42
3.2.2.2	Exactitud.....	44
3.3	Métodos de extracción	44
3.3.1	Optimización para la extracción por maceración y con agitación magnética.....	45
3.3.1.1	Volumen de metanol y cantidad de muestra	45
3.3.2	Optimización de la extracción asistida con ultrasonido	46
3.3.2.1	Extracción en línea indirecta con ultrasonido	46
3.3.2.2	Pruebas para la extracción.....	47
3.3.2.2.1	Cámaras de extracción para la EAU.....	47
3.3.2.3	Diseño de experimentos para optimizar la EAU	47
3.3.2.3.1	Experimentos preliminares.....	47
3.3.2.3.2	Diseño factorial 2 ³	48
3.3.2.3.3	Análisis de varianza (ANOVA).....	50
3.3.2.4	Experimentos para la extracción de agua en vainilla beneficiada EAU.....	51
3.3.2.4.1	Primeros experimentos	51
3.3.2.4.2	Optimización del número de ciclos de extracción	52
3.3.2.4.2.1	Cuantificación de la extracción de agua en vainas de vainilla beneficiada después de cada ciclo de extracción.....	52
3.3.2.4.2.2	Extracción de agua en vainas de vainilla beneficiada después de un número completo de ciclos de extracción	53
3.3.2.4.3	Verificación del volumen de metanol para la EAU en vainas de vainilla beneficiada.....	54
3.3.2.5	Evaluación de la extracción de agua en flor de jamaica.....	55
3.3.2.6	Influencia de la energía de ultrasonido en disoluciones de agua en metanol.....	56
3.3.2.7	Precisión de la extracción de agua con ultrasonido en muestras especias.....	57
3.3.2.8	Inyección de disoluciones de vainillina en el sistema FIA	58
3.3.2.9	Espectros de los extractos de las muestras en metanol.....	58
3.4	Análisis de muestras	59
3.4.1	Cuantificación de agua	59
3.4.2	Muestras de especias y granos de café.....	59
3.4.3	Recobros en extractos de especias y granos de café después de la EAU.....	63
3.4.4	Comparación por regresión de la extracción con disolventes convencional con la EAU.....	65
3.4.5	Ventajas de la EAU acoplada a un sistema FIA.....	65
3.5	Exactitud del método de secado.....	67
3.6	Comparación entre la extracción con disolventes y el método de secado.....	68

3.6.1	Tierras diatomáceas fortificadas.....	68
3.6.1.1	Estudio de significancia entre la extracción asistida con disolventes y el método de secado en estufa.....	69
3.7	Comparación entre métodos.....	70
4	CONCLUSIONES	72
5	EXPECTATIVAS	73
6	REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Proceso de Cavitación.....	21
Figura 1.2 Cavitación de una burbuja en un líquido irradiado con ultrasonido cerca de la superficie de un sólido	22
Figura 1.3 Extracción indirecta utilizando un baño de ultrasonido.....	23
Figura 2.1 Configuración FIA para la determinación de agua con el reactivo de Karl Fisher.....	29
Figura 2.2 Configuración FIA acoplada a la extracción por agitación magnética o maceración.....	34
Figura 2.3 Configuración FIA acoplada a la extracción asistida con ultrasonido focalizado	35
Figura 2.4 Configuración FIA acoplada a la extracción asistida con ultrasonido focalizado	36
Figura 3.1 Espectro de absorción del reactivo de Karl Fischer.....	38
Figura 3.2 Diagrama del 0.2 % al 5 % (v/v) de agua en metanol por triplicado, con un volumen de muestra de 5 μ L a 650 nm	39
Figura 3.3 Diagrama de 0.05 % a 0.8 % (v/v) de agua en metanol con un volumen de muestra de 5 μ l a 600 nm	40
Figura 3.4 Curva de calibración final	42
Figura 3.5 Primeras pruebas de la extracción asistida con ultrasonido	48
Figura 3.6 Eficiencia de extracción de agua en 1 g de vaina de vainilla beneficiada aumentando los ciclos de irradiación	53
Figura 3.7 Eficiencia de extracción por triplicado en vainas de vainilla beneficiadas aumentando los ciclos de extracción.....	54
Figura 3.8 Extracción de agua en 1 g de vainas de vainilla beneficiada cambiando el extractante	55
Figura 3.9 Espectros de absorción de diversos extractos de especias en metanol	58
Figura 3.10 Inyección al sistema FIA de tres extractos de vainilla en metanol.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales Usos, Componentes y Lugares de Origen de las Especies Utilizadas.....	7
Tabla 3.1 Resultados de la determinación de la reproducibilidad y repetibilidad, expresados como % (v/v) de agua.....	43
Tabla 3.2 Análisis de varianza (ANOVA)	43
Tabla 3.3 Experimentos del Diseño Factorial.....	49
Tabla 3.4 Análisis de Varianza.....	50
Tabla 3.5 Precisión en la extracción de agua en perejil y vainas de vainilla beneficiada utilizando la EAU.....	57
Tabla 3.6 Contenido de agua y humedad en las muestras analizadas.....	60
Tabla 3.7 Método de secado hasta peso constante para las muestras de especias	62
Tabla 3.8 Recobros en muestras de especias secas y granos de café	64
Tabla 3.9 Correlación entre los valores obtenidos con la extracción asistida con ultrasonido y los de maceración y agitación magnética	65
Tabla 3.10 Tiempos de extracción y análisis utilizado los métodos de extracción con disolventes.....	67
Tabla 3.11 Comparación entre el sistema FIA para la determinación de agua y el método de secado en tierras diatomáceas fortificadas.....	69

RESUMEN

El contenido de agua resulta muy importante para la caracterización y el control de calidad en una gran variedad de materiales. En el caso de los alimentos se encuentra directamente relacionado con su estabilidad y calidad; es importante distinguir entre el contenido de agua y de humedad. Para llevar a cabo la determinación del contenido de agua existen diversos métodos analíticos; sin embargo, la titulación del agua con el reactivo de Karl Fischer propuesta en 1935 sigue siendo el más utilizado. En el caso de la humedad, las determinaciones se hacen por pérdida de peso al someter la muestra a temperatura.

En este trabajo se propone el análisis por inyección en flujo (FIA) como alternativa para la determinación de agua con el reactivo de Karl Fischer, en muestras de especias y granos de café en su mayoría de origen mexicano. Para liberar el agua en muestras sólidas se necesita llevar a cabo un proceso de extracción en metanol previo a la cuantificación, de tal forma que se acopló un sistema de extracción asistida con ultrasonido al sistema FIA para la determinación de agua con detección espectrofotométrica a 600 nm, con el fin de ahorrar tiempo en los procesos de extracción y la cuantificación de los extractos.

De igual forma, en este trabajo se comparó el método de extracción propuesto contra los métodos tradicionales para la extracción de agua en muestras de especias secas y granos de café, que consisten en poner la muestra en contacto con metanol con agitación magnética o maceración durante 30 minutos o una hora, respectivamente, y el método de secado en estufa a una temperatura de 105 ± 3 °C por períodos de 4 horas hasta peso constante.

Si bien los resultados que se obtienen con los tres métodos de extracción con disolventes son similares, la extracción asistida con ultrasonido para muestras con un contenido de agua menor al 12 % (v/p), requiere sólo de 2 minutos y para muestras con más del 12 % (v/p), se necesitan 9 minutos, por lo cual disminuye notablemente el tiempo de extracción y de análisis comparado con los métodos tradicionales.

Los resultados obtenidos con las extracciones asistidas con disolventes y los datos obtenidos por el método de secado hasta peso constante, presentan notables diferencias, las cuales se atribuyeron a la pérdida de material volátil junto con el agua de la muestra.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar y evaluar un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) como alternativa para la determinación de agua con el reactivo de Karl Fischer, acoplada a la extracción asistida con ultrasonido en especias y granos de café.

Objetivos Específicos

Montar y evaluar el método de análisis por inyección en flujo para la determinación de agua con el reactivo de Karl Fischer.

Desarrollar un método de extracción de agua asistido con ultrasonido en línea en muestras de especias y granos de café de origen mexicano.

Optimizar los parámetros de extracción, tales como: cantidad de muestra y extractante, ciclos de extracción, potencia, tiempo de irradiación y no irradiación.

Comparar el método de extracción propuesto con los métodos convencionales de extracción de agua en este tipo de muestras.

1 FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE AGUA Y HUMEDAD

La medición de la humedad, o bien el contenido de agua en los alimentos, es importante por razones tales como la calidad de los alimentos, su costo, la conveniencia para el empaque y la uniformidad para expresar otras determinaciones analíticas como el valor nutricional ^[1].

Es importante distinguir entre el contenido de agua y de humedad. El contenido de agua se conoce mediante una determinación selectiva, mientras que el contenido de humedad se obtiene, bajo ciertas condiciones, por técnicas de secado y se debe nombrar como pérdida de masa (indicando las condiciones de secado); este tipo de determinación puede incluir por una parte la materia volátil, o bien, parte del agua no se puede detectar de esta forma ^[2].

El contenido de materia seca en los alimentos está inversamente relacionado con la cantidad de humedad que contiene, lo cual tiene gran importancia en la estabilidad y calidad de los alimentos, principalmente en la velocidad de descomposición de vegetales y especias deshidratadas ^[3, 4].

La medición de la humedad o del agua son dos de las determinaciones más importantes y ampliamente utilizadas en el procesamiento y análisis de los alimentos. Sin embargo, aun se trata de análisis en los que resulta difícil obtener datos precisos y exactos.

La determinación de agua en alimentos es engañosamente simple, ya que se enfrentan diversos problemas para esta medición. Debido a que el agua es un componente de nuestro medio ambiente, es necesario prevenir la transferencia de agua del medio ambiente hacia la muestra o de la muestra al medio.

En primer lugar, se debe definir la cantidad de agua que se debe medir, viéndose entonces la inherente complejidad del tema. El agua presente en los alimentos puede estar en al menos tres formas. Una cierta cantidad puede estar presente en

forma de agua libre en los poros del material, este tipo de agua mantiene sus propiedades físicas y sirve como agente dispersante para sustancias coloidales y como disolvente para sustancias cristalinas. Otra parte del agua está absorbida en la superficie macromolecular de los coloides. Finalmente, parte del agua está enlazada en combinación con varias sustancias, como es el caso del agua de hidratación.

Esta clasificación aunque resulta conveniente, es completamente arbitraria. Si bien se han realizado muchos intentos para determinar cuantitativamente los diferentes tipos de agua en alimentos, éstos no han sido del todo exitosos. Consecuentemente, los términos libre, absorbida y enlazada son relativos; como el contenido de agua no es bien conocido, las condiciones que se usan para la determinación de humedad son arbitrarias ^[1, 3, 4].

Dependiendo de la forma en la que se encuentra el agua presente en los alimentos, el método para la determinación de la humedad puede medir más o menos de la cantidad presente. Por esta razón, existen diversos métodos oficiales, la mayoría de ellos para un grupo de productos o bien para un producto en particular ^[4].

Debido a la importancia del contenido de agua en especias y semillas y a la dificultad para su cuantificación, en este trabajo se propone un método para determinar la cantidad de agua en muestras de especias, vainas de vainilla beneficiadas y granos de café.

1.2 ESPECIAS

Aunque no existe una distinción clara entre los términos hierbas o especias, se dice que las hierbas son plantas con fragancia no maderables, de las cuales se utilizan las hojas, tallos, flores y semillas, generalmente frescas. Mientras que las especias son las partes secas de las plantas aromáticas, incluyendo semillas, flores y hojas. Ambas se utilizan para sazonar diversos tipos de platillos o dar sabor a algunos alimentos.

Hierbas y especias se incorporan en los alimentos sólo en pequeñas cantidades, ya que hacen una gran contribución al olor y sabor de los alimentos, debido a la presencia de sus aceites esenciales ^[5].

El uso de las especias se ha incrementado significativamente con el paso de los últimos años, debido no sólo a su poder saborizante, sino también a sus propiedades antioxidantes. La Asociación Americana de Comercio de Especias estimó que para el año 2000 el uso de especias en los Estados Unidos podía alcanzar casi un billón de libras. En 1996 el consumo de especias era 50 % mayor que en 1986, con un consumo anual por persona de 3 libras.

Para la mayoría de las aplicaciones, las especias requieren ser procesadas antes de su uso. El proceso suele incluir dos pasos muy importantes que son la reducción del tamaño y la deshidratación del producto ^[6].

Con el crecimiento del uso de especias se ha incrementado el estudio en sus componentes activos, al igual que en mejores métodos para su conservación. Un parámetro directamente relacionado con la conservación de las especias es el contenido de agua. Preferentemente se han utilizado dos métodos para la determinación del agua en la muestra: la determinación por destilación con tolueno o el método de secado en estufa, el cual en muchos casos puede requerir de más de 12 horas ^[5].

En este trabajo se realizó el análisis del contenido de agua y humedad en: hoja de aguacate (*Persea americana mill*), damiana (*Turnera aphrodisiaca*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), jamaica (*Hisbiscus sabdariffa*), pimienta gorda (*Pimienta dioica myrtacea*), pingüica (*Arctostaphylos pungens*), cilantro (*Coriandrum sativum L.*), orégano (*Origanum vulgare*), perejil (*Petrose linum crispum*), hierbabuena (*Mentha piperita*) y vainas de vainilla beneficiada (*Vanilla fragans*), las cuales se obtuvieron ya deshidratados y empaquetadas ^[7-20].

El interés de este trabajo se centró principalmente en especias mexicanas, aunque los análisis se realizaron también en algunas especias que no son de origen

mexicano, pero que se incluyeron ya que se han adaptado al clima de nuestro país. En la Tabla 1.1 se resumen los principales usos de cada una de las especias, así como los principales componentes de su aceite esencial y su lugar de origen.

Tabla 1.1 Principales Usos, Componentes y Lugares de Origen de las Especias Utilizadas

Nombre común	Principales componentes del aceite esencial	Principales usos	Lugar de origen
Damiana	1-8 cineol, <i>p</i> -cimeno, α y β -pineno, timol, α -copaeno y celameno	Medicinal y afrodisíaco en presentación de té o licor de damiana	México y Sudamérica ^[7, 8]
Cilantro	Linalol, <i>p</i> -cimeno, α y γ -terpineno	Saborizante de diversos platillos mexicanos, hindúes y chinos	Asia Menor ^[9, 10]
Epazote	Ascaridol, <i>p</i> -cimol, α -terpineno, metadieno	Saborizante en la cocina y auxiliar en el tratamiento contra parásitos estomacales	México y Sudamérica ^[8, 11]
Hierbabuena	Carvona, dihidrocarvona, dihidrocarvonol, mentol	Se utiliza como saborizante en gomas de mascar, pastas dentales, bebidas suaves, etc., además tiene usos medicinales, especialmente para tratar afecciones estomacales	Gran Bretaña ^[5, 12]
Hoja de aguacate	Quercetina	Utilizado como antiinflamatorio y para dar sabor a diversos platillos	México y Perú ^[13]
Flor de Jamaica	Ácido gálico, ácido caféico	Usos culinarios y diurético	Zonas tropicales de África ^[14]
Perejil	α -pineno, miristicina, mirceno	Saborizante en diversos platillos y con usos medicinales	Mediterráneo Europeo ^[5, 21]
Pimienta gorda	Eugenol y en menor cantidad metileugenol, β -carifileno, α -terpineol	En la industria de los alimentos para dar sabor a productos cárnicos, aderezos, salsas, etc. En farmacia, perfumería, jabones y cosméticos. Usos medicinales como anestésico y antidiarréico	Las Antillas y Centroamérica ^[15-17]
Pingüica	No reportados	Uso decorativo y medicinal	México ^[18, 22]
Orégano	Carvacrol, timol y <i>p</i> -cimeno	Saborizante en alimentos	Zonas del Mediterráneo ^[19]
Vainilla	Vainillina, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído	Como saborizante y en perfumería	México ^[20]

Todas estas especias se usan como saborizantes en diversos tipos de alimentos, con fines terapéuticos y hasta como afrodisíacos, como ocurre con la damiana.

La composición química de las especias varía significativamente según su tipo y procedencia. Sus componentes se distribuyen de la siguiente forma: del 3 % al 20 % de carbohidratos, del 1 % al 5 % de compuestos nitrogenados, del 0.6 % al 2.5 % de fibra, del 0.5 % al 1.5 % de minerales, del 0.1 % al 0.9 % de lípidos, en cantidades trazas se encuentran vitaminas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, sustancias aromáticas, pigmentos y otros ^[23].

1.3 GRANOS DE CAFÉ

Además de las especias también en el grano de café resulta importante el contenido de agua. De acuerdo a la norma NMX-F-552-1998-SCFI, la determinación de la humedad en el grano de café verde se hace por secado en estufa ^[24, 25].

Los granos de café se someten a diferentes procesos entre los cuales destacan, el tostado y descafeinado. La variedad arábica corresponde al 75 % de la producción mundial; en este trabajo se utilizaron muestras de café cultivado en Chiapas de esta variedad, de los siguientes tipos: planchuela verde, planchuela tostado, caracolillo tostado, caracolillo verde, planchuela descafeinado verde y planchuela descafeinado tostado ^[26].

Los granos de café verde se pueden comportar de manera muy diferente cuando poseen diferentes contenidos de agua. El contenido excesivo de agua puede tener consecuencias no deseadas, como el crecimiento microbiano o formación de micotoxinas las cuales alteran la calidad sensorial del producto final y generan condiciones inestables en la producción y poco óptimas para el comercio. El contenido de agua en los granos de café verde debe estar en el intervalo de entre 8.0 % y 12.5 %, el cual se considera adecuado para evitar el crecimiento microbiano, mientras que el contenido de agua en el grano de café tostado no debe ser superior al 5 %, siendo en promedio del 2.5 %, ya que el agua se evapora durante el proceso de tostado ^[26-28].

1.4 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN Y/O DETERMINACIÓN DE AGUA EN ALIMENTOS

Entre los principales métodos que se han usado para realizar este tipo de determinación se encuentran el secado por temperatura, la destilación utilizando disolventes orgánicos, la titulación con el reactivo de Karl Fischer y, en menor grado, determinaciones utilizando cromatografía de gases ^[1, 3, 29], espectroscopia de infrarrojo ^[30, 31], métodos eléctricos: dieléctrico y por conductividad ^[3, 4], hidrometría ^[4] y refractometría ^[3, 4, 32]. En este trabajo únicamente se describen los tres primeros métodos, los cuales se consideran los más importantes.

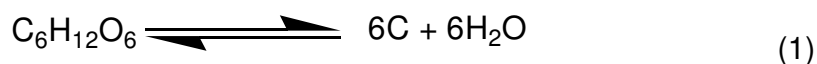
1.4.1 Métodos de secado

Los procedimientos para la determinación del contenido de humedad generalmente involucran métodos de secado con temperatura, donde la muestra se calienta bajo ciertas condiciones y la pérdida de peso en la muestra se toma como el contenido de humedad.

Cualquier método de secado se basa en el hecho de que el punto de ebullición del agua es de 100 °C, sin embargo, esto ocurre sólo con agua pura al nivel del mar. Cuando 1 mol de soluto se disuelve en 1 L de agua, el punto de ebullición del agua se eleva 0.512 °C. Esta elevación del punto de ebullición continua conforme se remueve mayor cantidad de agua y aumenta la concentración del soluto. El agua libre es la que se remueve más fácilmente de los tres tipos de agua mencionados ^[4].

La pérdida de humedad en una muestra durante el análisis, está en función del tiempo y la temperatura. Conforme se extiende el tiempo o se aumenta la temperatura, la descomposición de dicha muestra es mayor. Por tanto, es necesario hacer un compromiso entre el tiempo y la temperatura de análisis, bajo los cuales se limite la descomposición, además de tomar en cuenta que la velocidad a la cual se remueve la humedad de una muestra sólida es función de la presión de vapor y de la temperatura de secado.

Uno de los mayores problemas de este tipo de métodos es la descomposición de algunos componentes de la muestra por la temperatura, como es el caso de los carbohidratos a una temperatura de 100 °C, con lo cual se genera agua, como indica la siguiente reacción.



Otras reacciones químicas pueden consumir agua, lo cual reduce el contenido de agua en la muestra.

Otro problema que se puede volver un error constante en las mediciones es la pérdida de material volátil, como el ácido acético, propiónico y butírico; alcoholes, ésteres y aldehídos, los cuales se encuentran entre los componentes responsables del sabor y olor de los alimentos ^[3, 4].

Sin embargo, los métodos de secado son simples, directos y permiten el análisis de manera simultánea de una gran cantidad de muestras, por lo que se continúan utilizando ampliamente para el análisis de muchos tipos de alimentos, a pesar de que se necesitan varias horas para analizar una muestra dependiendo del contenido de humedad presente en ésta. Para el caso de la mayoría de las especias deshidratadas toma alrededor de 12 horas ^[1, 3].

Los métodos de secado utilizan temperaturas y tiempos específicos de secado que se deben controlar cuidadosamente. Considerando la variación de la temperatura existen tres tipos de hornos: de convección, de corriente de aire y de vacío. Recientemente se han creado otras dos alternativas: el secado utilizando la radiación de infrarrojo y el uso de las microondas.

La mayor variación de temperatura se da en los hornos de convección, debido a que el aire circula lentamente, le siguen los hornos con corriente de aire donde la variación de la temperatura no es mayor a 1 °C, ya que el aire circula con ayuda de un ventilador y, finalmente, los hornos de vacío, donde se da la menor variación

de temperatura en el interior del horno y también se puede controlar la presión [1, 4, 3].

El uso de radiación infrarroja para calentar la muestra puede acortar el tiempo de análisis comparado con los hornos antes mencionados, sin embargo, resulta en una mayor probabilidad de degradación.

Una alternativa a los diversos tipos de hornos y a la radiación infrarroja es el uso de energía de microondas. Recientemente, este método se está introduciendo en el mercado a pesar de tener varias desventajas: la diferencia que existe entre el diseño de los hornos de microondas ha resultado en que para cada método se utilice un modelo en particular, además, no se ha obtenido buena precisión en los resultados [1].

En este trabajo se utilizó un horno de convección, ya que continúa siendo el más usado para este tipo de determinaciones.

1.4.2 Métodos de destilación

Los métodos de destilación se han utilizado para las determinaciones de humedad en alimentos por más de 100 años. Éstos involucran la co-destilación del agua de una muestra utilizando un disolvente de punto de ebullición mayor al agua e inmisible con ésta. El agua que se co-destila con el disolvente, al ser inmisible con éste, se puede medir fácilmente. Existen dos procedimientos de destilación: directo y por reflujo.

En la destilación directa la muestra se calienta con aceite mineral, los vapores resultantes se condensan y colectan para poderse medir. Sin embargo, la destilación por reflujo es la más usada actualmente. En la destilación por reflujo el disolvente se recircula, así que la destilación es más eficiente. Los disolventes más utilizados en este tipo de destilación son tolueno, benceno y xileno.

Una destilación por reflujo toma de 1 a 48 horas, dependiendo del tipo de muestra, utilizando 100 g de muestra con 150 mL de disolvente (1, 4, 3). En el caso particular de la vainilla se requiere de 100 mL de una solución benceno-tolueno (80-20 %

v/v) y 40 g de vainas de vainilla. No todas las especias pueden analizarse por el método de destilación debido a que los carbohidratos se descomponen produciendo mayor cantidad de agua, tal como ocurre en el método por secado según la Ecuación 1 [4, 33, 34].

Se han encontrado muchas dificultades para la determinación de agua por este tipo de métodos. Éstas incluyen poca precisión para medir el agua colectada por: la dificultad para leer los meniscos, la adherencia de gotas de agua en el dispositivo de destilación, la solubilidad del agua en el disolvente usado para la destilación, evaporación incompleta del agua y destilación de componentes de la muestra solubles en agua principalmente.

Otro problema que se debe agregar a este método, es que si bien causa menor descomposición en algunos tipos de alimentos que los métodos de secado a temperaturas elevadas, algunas reacciones químicas producidas por el calor sólo se reducen y no son del todo eliminadas, por lo cual siguen constituyendo un error en el método. Además, en el caso de compuestos con alto contenido de azúcar se tiene el problema de la formación de caramelo.

Entre los principales inconvenientes para utilizar este tipo de métodos se encuentran la cantidad de disolventes que se utiliza (de 100 ml a 150 ml por análisis), la cantidad de muestra (entre 40 g y 50 g) y el tiempo que se requiere para realizarlos (de 1 a 48 horas, dependiendo del tipo de muestra), por lo cual difícilmente se pueden adaptar al trabajo de rutina en un laboratorio de control de calidad [1, 4, 3].

Debido a la naturaleza de este análisis y a que cada vez se está procurando utilizar otro tipo de métodos, este procedimiento no se evaluó en este trabajo.

1.4.3 Titulación con el reactivo de Karl Fischer

La titulación con el reactivo de Karl Fischer (RKF) es un método muy utilizado para la determinación del contenido de agua en muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Esta técnica es la preferida a nivel industrial para el control de calidad, debido a

que es útil para realizar el análisis de la cantidad de agua en alimentos en los que se obtuvieron resultados erráticos cuando se sometieron al método de secado. Además es un método rápido, exacto, selectivo para el agua y no requiere del uso de calor en la mayoría de los casos, por lo cual no se producen descomposiciones.

Este método se escoge para las determinaciones de agua en alimentos con bajos contenidos de agua como frutas y vegetales secos, dulces, chocolates, café tostado, aceites y grasas, al igual que para alimentos con alto contenido de azúcares o proteínas [1, 4, 35].

La reacción de Karl Fischer está basada en la reacción descrita por R.W. Bunsen en 1853, la cual involucra la reducción de yodo por dióxido de azufre en presencia de agua.

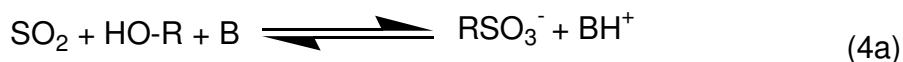


De acuerdo con la Ecuación 2, para la reacción es necesario dióxido de azufre y que los protones producidos en la reacción sean neutralizados por una base. En 1935 Karl Fischer formuló la siguiente reacción, utilizando metanol como disolvente:



donde Py representa a la piridina. El punto final donde se consume toda el agua presente se indica por el cambio de color, de amarillo a café.

En los años posteriores se ha examinado la reacción anterior y la versión aceptada desde 1984 es la siguiente:



Donde R-OH es un alcohol, el más utilizado es metanol y B es una base. En un principio se utilizó piridina pero en la actualidad se ha sustituido por dietanolamina, metilimidazol, imidazol, entre otras.

Por cada mol de agua, se consumen 1 mol de yodo, 1 mol de dióxido de azufre, 3 moles de base y 1 mol de metanol. Por tanto la cantidad de agua se consume estequiométricamente y el contenido de agua en la muestra, se determina cuantitativamente de forma indirecta ^[1, 2, 35-37].

Debido a la presencia de agua en el medio ambiente, el reactivo de Karl Fischer no es estable, la cantidad de yodo presente en el reactivo de Karl Fischer se debe titular continuamente, para saber el valor real. Con este fin se puede utilizar agua pura, sales con un contenido constante de agua o estándares de agua en un líquido. El tartrato de sodio dihidratado es el patrón primario, no es higroscópico y tiene un contenido constante de agua de 15.66 % ^[1, 37, 38].

La determinación de agua por el método de Karl Fischer se puede hacer de dos maneras: volumétrica y coulombimétrica.

En la titulación volumétrica el reactivo de Karl Fischer se adiciona a la muestra que se encuentra en una cámara cerrada protegida de la humedad del medio ambiente. El exceso de I₂ se puede determinar visualmente pero se requiere de mucha práctica.

Otra forma de ver el punto final es por conductometría, donde se utiliza como indicador un electrodo de doble punta de platino, que se somete a una corriente de polarización. Para mantener la corriente constante en un medio muy poco conductor, se necesita una tensión muy alta. Cuando toda el agua ha reaccionado, el exceso de yodo hace el medio conductor y la tensión se reduce. La reducción del valor de la tensión a un cierto valor indica el punto final de la valoración ^[1, 35].

Existe otra forma de determinar el punto final de la titulación volumétrica de Karl Fischer, la cual consiste en la medición espectrofotométrica del cambio de color al final de la titulación. Se han reportado diversas longitudes de onda (550 nm, 620

nm y 625 nm) para llevar a cabo la medición del contenido de agua utilizando el reactivo de Karl Fischer ^[39-41].

Un segundo tipo de titulación es la coulombimétrica, la cual se utiliza para muestras con cantidades de agua de ppm a 0.03% en la muestra. En este método, el yodo se genera electrolíticamente y la cantidad de yodo necesaria para titular el agua presente se determina por la corriente necesaria para generar el yodo ^[1, 35].

1.4.3.1 Extracción de agua

La titulación con el reactivo de Karl Fischer sólo es posible cuando el agua está disponible en la muestra. Éste no es el caso cuando se trata de muestras sólidas. En ellas, el agua se encuentra combinada de diferentes maneras: en las células (plantas), en poros (minerales) o como agua de cristalización (sales). Para liberar el agua de esas muestras hay que usar procedimientos de preparación de muestras y métodos de Karl Fischer especiales ^[1, 42].

Los procedimientos de extracción varían según el tipo de muestra que se vaya a analizar. En la mayoría de los casos se utiliza metanol, la extracción clásica consiste en la extracción en reposo o con agitación de la muestra en metanol ^[43]. Otros autores han reportado que el tiempo de extracción se reduce, si se calienta la muestra con metanol en el vaso de valoración o la muestra se corta finamente utilizando un homogenizador. Después de que el agua se ha liberado, el extracto en metanol se titula utilizando el reactivo de Karl Fischer ^[34, 42].

Los métodos de Karl Fischer especiales consisten en la determinación del agua con ayuda de un horno de secado donde la muestra se calienta, el agua evaporada se arrastra utilizando un gas inerte y seco hasta el vaso de valoración, donde se titula el agua evaporada de la muestra ^[44, 45].

Aunque la titulación con el reactivo de Karl Fischer es un método efectivo para la medición del contenido de agua, existen varias fuentes de error que se deben tomar en cuenta:

- Extracción incompleta del agua de la muestra.
- Agua del medio ambiente.
- Agua adherida al material de laboratorio ^[1,4].
- La reacción de Karl Fischer es una reacción redox, el yodo es un agente oxidante. Así que el yodo puede reaccionar también con muestras fáciles de oxidar. Dicha reacción origina un consumo adicional de yodo. Las siguientes sustancias podrían reaccionar con yodo: ácido ascórbico, ácido bórico, tetraborato, sales de hierro (III), de cobre, de zinc (II) mercaptanos, peróxidos, los iones nitrito, arsenito, arsenato, selenito, carbonato, bifulsulfito, hidróxido y bicarbonato ^[36, 37].
- Interferencias de ciertos constituyentes de la muestra. Los más importantes son los compuestos carbonílicos, los cuales reaccionan con el metanol para formar acetales o cetales generando agua.

Existen reactivos de Karl Fischer disponibles para valorar muestras con este tipo de interferencias, los cuales contienen alcoholes (2-metoxipropanol, cloroetanol) que no forman cetales o acetales con la muestra debido al impedimento estérico que presentan, pero si llevan a cabo la reacción de Karl Fischer como se indica en las Ecuaciones 4a y 4b ^[1, 4, 36].

Una forma de disminuir las reacciones secundarias del reactivo de Karl Fischer es el uso de un sistema de inyección en flujo, ya que en este tipo de sistema el tiempo de reacción es tan corto que los efectos de las reacciones secundarias se minimizan ^[46, 47]. Por esta razón, en este trabajo se propone el uso de un sistema FIA para la determinación del contenido de agua en muestras de origen vegetal.

1.5 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

Uno de los principales progresos de la Química Analítica durante las tres últimas décadas, ha sido la aparición en el mercado de sistemas automáticos para análisis, que proporcionan datos analíticos con la mínima intervención del operador. Inicialmente, estos sistemas se diseñaron para solucionar las

necesidades de los laboratorios clínicos, en los que hay que determinar, de forma rutinaria, treinta muestras o más, con fines de diagnóstico. Hoy en día estos instrumentos se utilizan en áreas tan distintas como el control de procesos industriales o las determinaciones rutinarias de distintas sustancias en aire, agua, suelos, productos agrícolas y farmacéuticos.

Los instrumentos de este tipo tienen tres ventajas importantes. En los laboratorios que diariamente realizan un elevado número de análisis de rutina, mediante la automatización se puede lograr un ahorro enorme en el tiempo de análisis y en el gasto de reactivos. La segunda ventaja es la velocidad de análisis, que suele ser significativamente mayor que la de los dispositivos manuales. Y por último, se pueden realizar análisis durante períodos prolongados de tiempo, más reproducibles de los que obtendría un operador utilizando un instrumento manual.

Los sistemas analíticos automáticos son de dos tipos: analizadores discontinuos y analizadores de flujo continuo. En un instrumento discontinuo, cada una de las muestras se mantiene como una entidad independiente, colocándose en recipientes separados durante las distintas operaciones de análisis. Por el contrario, en los sistemas de flujo continuo la muestra se va transportando desde el punto de inyección o introducción, hasta el detector y de aquí al desecho: la muestra forma parte de la corriente en la que va fluyendo y en ella van transcurriendo las diferentes operaciones unitarias.

Los métodos de análisis por inyección en flujo, FIA, por sus siglas en inglés, fueron descritos por primera vez a mediados de los años setenta por Ruzicka y Hansen en Dinamarca y Stewart y colaboradores en Estados Unidos ^[48, 49].

Estos métodos son una consecuencia de los métodos de flujo segmentado, muy utilizados en los laboratorios clínicos entre los años sesenta y setenta, para la determinación rutinaria y automática de distintas especies en sangre y orina, para diagnóstico médico. En estos sistemas las muestras eran transportadas a través del sistema hasta el detector por medio de una disolución acuosa, que contenía una serie de burbujas de aire muy próximas entre sí ^[50].

El análisis por inyección en flujo (FIA) posee las siguientes características:

- No está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos anteriores.
- La muestra líquida se inyecta directamente en el flujo.
- La muestra se transporta en flujo a través del sistema, utilizando un líquido que se conoce como portador.
- La dispersión de la muestra en el portador se puede controlar mediante las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible que da lugar a un gradiente de concentración variable a lo largo del sistema.
- Un sistema de detección continuo proporciona una señal transitoria que es convenientemente registrada, en lo que se conoce como fiagrama.
- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico ni químico.

Los componentes fundamentales de un sistema FIA son los siguientes:

- Sistema de inyección: permite introducir un volumen exactamente medido de la muestra, utilizando una válvula de inyección.
- Sistema de transporte: Las disoluciones circulan a través del sistema constituido por tubería mediante una bomba peristáltica. Existe una zona de tubo comúnmente llamada reactor en donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional.
- Reactor: puede ser un tubo recto, en forma de serpentín o relleno de bolitas inertes de vidrio. En muchos casos el reactor constituye una cámara de mezclado donde se lleva a cabo una disolución o una reacción química entre la muestra y otro reactivo. El avance de dicha reacción se mide posteriormente con un equipo de detección.

- Sistema de detección: Los instrumentos de medida pueden ser equipos de absorción atómica, fluorímetros, sistemas electroquímicos, refractómetros y espectrofotómetros, siendo estos últimos los más utilizados ^[50, 51].

1.5.1 Dispersión

En un sistema FIA, inmediatamente después de inyectar la muestra mediante una válvula de inyección, la zona de la muestra tiene un perfil de concentración rectangular. Al ir circulando por el interior del tubo, tiene lugar un ensanchamiento de la zona de dispersión de la muestra. El perfil resultante depende de dos fenómenos. Uno es la convección, asociada al flujo laminar en el que el centro del fluido avanza más rápidamente que el líquido adyacente a las paredes, lo que da lugar a un perfil parabólico.

También se produce ensanchamiento de zona por la difusión. Pueden producirse dos tipos de difusión: radial o perpendicular a la dirección del flujo y longitudinal o paralela al flujo. Se ha demostrado que la difusión longitudinal, en un tubo estrecho, no es significativa, sin embargo, la difusión radial, siempre y en cualquier circunstancia es importante.

En la dispersión, en el sistema FIA, influyen tres variables interrelacionadas y controlables: 1) el volumen de inyección de la muestra, 2) la longitud del tubo y 3) la velocidad de bombeo. Controlando dichas variables se busca obtener un solapamiento suficiente entre la muestra y el reactivo para dar lugar a la reacción, pero sin que la dispersión sea excesiva para lograr un compromiso entre el solapamiento y la dispersión de la muestra, dando como resultado picos simétricos y de la mayor altura posible ^[50].

1.6 PROCESOS DE EXTRACCIÓN

La extracción de los analitos de una matriz juega un papel muy importante en la química analítica; sin embargo, hasta hace apenas 15 años se ha reconocido su importancia en la obtención de datos analíticos de calidad ^[52].

Las técnicas de extracción tradicionales con disolventes están basadas en la elección correcta de los disolventes y el uso de calor y/o agitación para incrementar la solubilidad de los compuestos y la velocidad de la transferencia de masa. Usualmente estas técnicas requieren de tiempos de extracción prolongados aunque tienen baja eficiencia. Además de este problema, muchos productos naturales son térmicamente inestables y se pueden degradar durante un proceso de extracción con calor^[53].

Para obtener extractos vegetales existen diversos métodos como: destilación y extracción con disolventes; recientemente, se han introducido las técnicas de extracción con disolventes no convencionales, una de éstas es la extracción asistida con ultrasonido^[54].

1.6.1 Ultrasonido

Las ondas de sonido son vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas. El ultrasonido tiene una frecuencia mayor que el intervalo audible para el hombre (1-16 kHz). Se considera que la menor frecuencia de ultrasonido es de 20 kHz. El límite superior del ultrasonido sólo está limitado por la habilidad para generar las señales, se han reportado frecuencias en el intervalo de gigahertz (GHz)^[55, 56].

Las ondas de sonido viajan a través de la materia, lo cual involucra ciclos de expansión y compresión conforme atraviesan un medio. La expansión separa a las moléculas mientras que la compresión las junta. En un líquido, los ciclos de expansión producen una presión negativa. Si la onda tiene la suficiente frecuencia, los ciclos de expansión pueden crear burbujas o cavidades en el líquido. El proceso por el cual se forman, crecen y colapsan las burbujas se conoce como cavitación y se ilustra en la figura 1.1. Todo este proceso se lleva a cabo en 400 μ s.

La rápida compresión adiabática de los gases y vapores dentro las burbujas o cavidades, produce temperaturas y presiones extremadamente altas. Se calcula que la temperatura de estos puntos calientes es de cerca de 5000 °C y la presión de 1000 atm. Sin embargo, debido a que las burbujas son tan pequeñas

comparadas con el volumen total del líquido, el calor que ellas producen rápidamente se disipa sin que se vean cambios apreciables en las condiciones del medio.

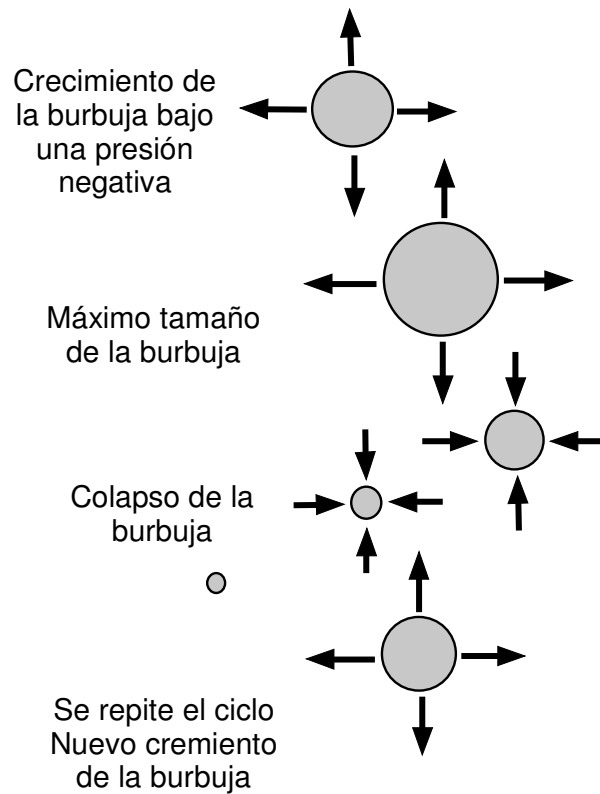


Figura 1.1 Proceso de Cavitación

Cuando la cavitación ocurre en un líquido cercano a la superficie de un sólido, la dinámica de la cavitación cambia dramáticamente. En líquidos puros, la cavidad retiene su forma esférica durante el colapso, debido a que sus alrededores son uniformes. Sin embargo, cerca de un sólido la cavidad colapsa de forma asimétrica y produce movimientos de líquido de alta velocidad, como se ilustra en la figura 1.2 ^[56, 57].

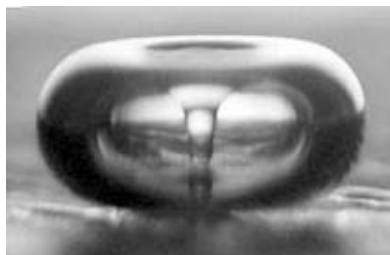


Figura 1.2 Cavitación de una burbuja en un líquido irradiado con ultrasonido cerca de la superficie de un sólido

De esta forma, el ultrasonido es de gran ayuda en el pretratamiento de muestras sólidas, ya que facilita y acelera operaciones como la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos, homogeneización y derivatización ^[57, 58].

La utilización de la radiación de ultrasonido para aumentar el rendimiento de extracción empezó en la década de los cincuentas del siglo pasado, donde se inició con experimentos a nivel laboratorio ^[51]. Actualmente se sabe que el uso del ultrasonido resulta en un incremento de la extracción de compuestos en menor tiempo y a menores temperaturas. El ultrasonido es capaz de acelerar el proceso de extracción de los principios activos de las plantas, debido a que rompe las paredes de las células y acelera la transferencia de masa del contenido de las éstas. Los tiempos de extracción se reducen de 24 horas a 30 minutos ^[53, 59].

Existen dos tipos de dispositivos para aplicar el ultrasonido: los baños de ultrasonido y el ultrasonido focalizado.

Los baños de ultrasonido son los más comunes. Sin embargo, cuando se realiza una extracción indirecta en este tipo de dispositivos, no existe uniformidad en la distribución de la energía de ultrasonido, ya que sólo una pequeña fracción de la muestra experimenta la cavitación. En la figura 1.3 se muestra un esquema de este tipo de extracción ^[56, 58].

Mientras que en el siguiente tipo de dispositivo, el ultrasonido se focaliza en una punta de titanio. La energía se focaliza en una zona de la muestra, por tanto la cavitación en el líquido es más eficiente ^[56].

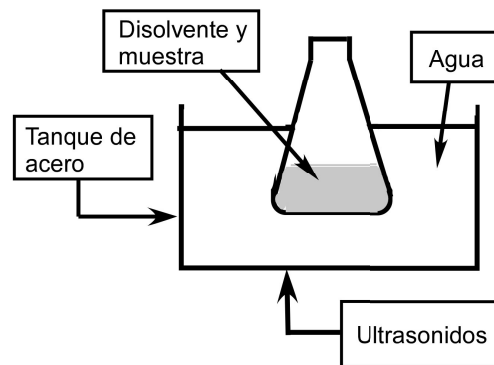


Figura 1.3 Extracción indirecta utilizando un baño de ultrasonido

Aunque, las extracciones automáticas son raras, la aplicación del ultrasonido es un punto importante para la investigación posterior, ya que los dispositivos de ultrasonido focalizado facilitan dicha operación. La principal ventaja de la extracción asistida con ultrasonido de modo continuo, es que el gasto de reactivos es menor comparado con el método manual, además de que aumenta la velocidad de análisis.

Existen dos formas de llevar a cabo la extracción en continuo asistida con ultrasonido: los sistemas abiertos y los sistemas cerrados.

En los sistemas abiertos el extractante fluye continuamente a través de la muestra, así que el equilibrio de la transferencia de masa se desplaza hacia la solubilización del analito en la fase líquida o extractante. Este modo de operación tiene como desventaja la dilución del analito en el extractante, por lo cual es necesario otro paso de concentración.

Los sistemas cerrados consisten en que un volumen del extractante predeterminado circula continuamente a través de la muestra sólida. La dirección del flujo se puede mantener en la misma dirección durante toda la extracción o se puede cambiar en intervalos predeterminados. En este tipo de sistema el extractante está menos diluido que en el sistema anterior.

La utilidad de la extracción continua asistida con ultrasonido ha demostrado su aplicabilidad para la determinación de hierro en material vegetal y boro y cromo hexavalente en suelo ^[56].

En este trabajo se construyó un sistema FIA acoplado a la extracción asistida por ultrasonido, para la determinación de agua en muestras vegetales.

2 METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

2.1.1 Instrumentación

Se utilizó un espectrofotómetro Cary 3 UV-VIS (Varian, Sydney, Australia) equipado con una celda de cuarzo de 18 μ L. Para construir la configuración de flujo continuo se usó: una bomba peristáltica Gilson Minipuls-3 (Villiers-le Bel, Francia), una bomba peristáltica Ismatec de 4 canales, una válvula de inyección Rheodyne 5041 (Rohnert Park, Calif., USA), tubos de bomba resistentes al paso de disolventes, conectores en forma de T de PTFE y tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.

La radiación de ultrasonido se aplicó utilizando un equipo de ultrasonido Branson 450 digital (20 kHz, 400 W), equipado con una micropunta cilíndrica de titanio (4.8 mm diámetro). La punta de titanio se sumergió aproximadamente 1 cm en el metanol con la muestra, dentro de la cámara de extracción. La cámara de extracción consistió en un cilindro de polietileno (9 cm de longitud y 4 cm de diámetro interno) y se cerró utilizando una tapa de polietileno con dos orificios de 10 mm de diámetro interno cada uno, hechos especialmente para permitir la entrada y salida del extractante hacía el sistema de inyección en flujo al final del tiempo de extracción.

Para pesar las muestras se utilizó una balanza marca Ohaus con una precisión de 0.1 mg. También se utilizó un estufa marca Rios-Rocha modelo H-41, para realizar el secado de las muestras.

2.1.2 Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos grado analítico: reactivo de Karl Fischer (RFK) de un sólo componente (Hydranal® Composite 5, No. 34805, Riedel de Haën) y metanol (Baker®, contenido de agua < 0.03 %).

Se emplearon dos tipos de materiales de referencia: en primer lugar el estándar Hydranal® de tartrato de sodio dihidratado, número de referencia. 34696 (15.64 ± 0.002 % de agua, $n = 3$) y el estándar de agua Hydranal® 10.0, número de referencia 34849 (10.04 ± 0.02 mg de agua, $n = 20$). Estos estándares son trazables a NIST SRM 2890.

Del estándar Hydranal® 10.0 se prepararon disoluciones estándar al 0.4 % (v/v) de agua en metanol.

2.1.3 Preparación de disoluciones

Se preparó una disolución madre al 2 % (v/v) de agua en metanol de la siguiente forma: se tomó 1 mL de agua destilada y se llevó a 50 mL con metanol en un matraz volumétrico. A partir de esta disolución se prepararon disoluciones estándar, para realizar la curva de calibración en un intervalo de concentración de entre 0.05 % y 0.8 % (v/v), tomando una alícuota apropiada de la disolución madre y aforando con metanol. La preparación de cada disolución se realizó lo más rápido posible para evitar la entrada de agua del medio ambiente y a continuación se colocó la tapa del matraz aforado y papel parafilm. Las disoluciones se prepararon cada vez que se utilizaron.

Todas las disoluciones se prepararon utilizando material de vidrio volumétrico, perfectamente seco. Para lograr que el material estuviera seco y limpio, se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente por varios días; una vez que esto se logró, se limpió con metanol antes de usarse.

2.1.4 Muestras analizadas

2.1.4.1 Especies

Todas las muestras se obtuvieron envasadas y deshidratadas de un supermercado local, a excepción de las vainas de vainilla, las cuales provenían de la región de Papantla, Veracruz, México. A continuación se enlistan los nombres comunes y científicos de las especias que se analizaron: hoja de aguacate (*Persea americana mill*), damiana (*Turnera aphrodisiaca*), epazote (*Chenopodium*

ambrosioides), flor de jamaica (*Hisbiscus sabdariffa*), pimienta gorda (*Pimienta dioica myrtacea*), pingüica (*Arcostaphylos pungens*), cilantro (*Coriandrum sativum L.*), orégano (*Origanum vulgare*), perejil (*Petrose linum crispum*), hierbabuena (*Mentha piperita*), y vainas de vainilla beneficiada (*Vanilla fragans*).

Para obtener una muestra homogénea, se utilizaron únicamente las hojas de aquellas especias en las que era posible hacer una distinción entre tallos y hojas; posteriormente se mezclaron las hojas, y de ahí se tomó la muestra que se analizó. Las especias en que se hizo esta distinción fueron: epazote, pingüica, cilantro y hierbabuena.

En el caso de especias donde no fue posible hacer dicha distinción, únicamente se mezcló todo el material vegetal y de esta mezcla se tomaron las muestras que se analizaron. Las especias que se trataron así fueron: hoja de aguacate, damiana, flor de jamaica, orégano y perejil. Aunque para las muestras de hoja de aguacate, las hojas se cortaron en trozos que no fueron superiores a 1.0 cm.

Las vainas de vainilla (15 x 1 cm) se cortaron en trozos menores a 0.5 cm, los cuales se mezclaron para homogenizar todas las vainas.

Un caso diferente fue el de la pimienta gorda, debido a que se trata de bolitas duras de diferentes tamaños que en su interior tienen pequeñas semillas. Por esto, se molieron con un mortero y pistilo de porcelana, hasta obtener trozos más pequeños y de tamaño uniforme. Al final todos los trozos se mezclaron.

Además de estas muestras, también se analizaron: perejil (*Petrose linum crispum*), cilantro (*Coriandrum sativum L.*) y hierbabuena (*Mentha piperita*), sin deshidratar. Éstas también se adquirieron en un mercado local.

Para cada especia sin deshidratar o fresca, la homogenización de la muestra consistió en cortar los tallos de las plantas, quedando únicamente el follaje de la planta, el cual se cortó en trozos menores a 1 cm de largo. Todos los trozos obtenidos se mezclaron para obtener una muestra homogénea.

Las muestras frescas se guardaron en un refrigerador, pero aun así su tiempo de vida es muy corto, por lo cual todos los análisis se realizaron en no más de una semana.

2.1.4.2 Café en grano

Todas las muestras de café fueron de la variedad arábica provenientes de Chiapas, México y se obtuvieron en forma de granos. A continuación se nombran los tipos de café que se analizaron: planchuela y caracolillo verde y tostado y planchuela descafeinado verde y tostado.

Los granos de café se utilizaron enteros para el procedimiento de secado en estufa, mientras que para las extracciones con disolventes se sometieron a un proceso previo de homogenización. Cada muestra de café se molió utilizando una licuadora, hasta obtener una mezcla homogénea. Para las muestras de café tostado, el tiempo de molido fue menor a cinco minutos, pero en el caso de las muestras de café verde fueron necesarios varios períodos de cinco minutos, hasta obtener muestras homogéneas de café molido.

2.2 PROCEDIMIENTO

2.2.1 Sistema de Inyección en Flujo (FIA) para la determinación del contenido de agua utilizando el reactivo de Karl Fischer (RKF)

Antes de empezar la determinación de agua con el sistema FIA fue necesario hacer pasar metanol por todo el sistema durante 5 minutos. Después de hacer esto se encendió el espectrofotómetro y se bombeó el RKF, diluyente y portador hasta que se obtuvo una línea base estable.

Para construir el sistema FIA se utilizó una bomba peristáltica de cuatro canales. A través del primer canal se hizo pasar el reactivo de Karl Fischer (RKF). Por el segundo canal se hizo pasar el metanol o diluyente. Tanto el metanol como el RKF se bombearon a un caudal de 0.6 mL/min. El RKF y el metanol confluían en un reactor de dilución de 200 cm de largo, para luego pasar a un reactor de reacción de 160 cm. Por el tercer canal se bombeó el metanol o portador. Finalmente, a

través del cuarto canal se hizo pasar la muestra a analizar. El portador se bombeó con un caudal de 0.8 mL/min mientras el caudal de la muestra fue de 0.6 mL/min [41, 60].

En primer lugar se llena el bucle de inyección de 5 μ L y a continuación se inyecta la muestra al sistema. En el reactor R_2 , la muestra y el portador confluyen con el reactivo de Karl Fischer diluido donde se lleva a cabo la reacción entre la muestra y el RKF. Posteriormente, el producto de la reacción pasa por el sistema de detección espectrofotométrica y se mide el cambio de absorción a 600 nm, en una señal transitoria. Cada muestra se inyecta tres veces y se hace un promedio.

El proceso completo de salida de la señal transitoria y de regreso a la línea base toma alrededor de 1.5 minutos. Por medio de la válvula de inyección, el bucle de inyección se llena cuando la señal de la muestra anterior empieza a salir en el diagrama y la siguiente muestra se inyecta en el momento que la señal lleva tres cuartas partes de avance. En la figura 2.1, se ilustra la configuración FIA utilizada.

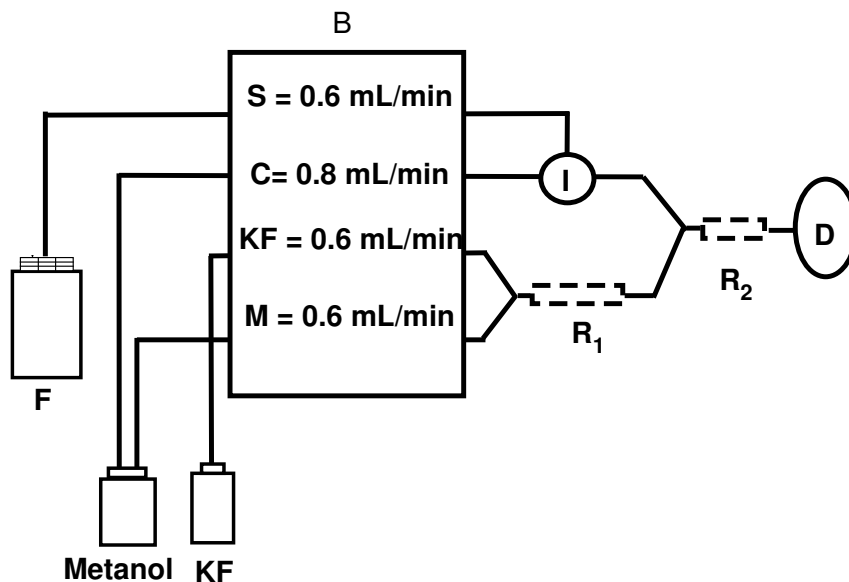


Figura 2.1 Configuración FIA para la determinación de agua con el reactivo de Karl Fisher Donde B = bomba peristáltica, F = contenedor con la muestra o estándar, KF = reactivo de Karl Fischer, S = muestra, C = portador, M = metanol, R_1 = reactor de dilución, R_2 = reactor de reacción, I = válvula de inyección, D = equipo de detección espectrofotométrica

2.2.2 Precauciones con los reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron para llevar a cabo la determinación de agua en las diferentes muestras y estándares se taparon para evitar contaminación del agua del ambiente. Para lograr esto, todas las tapas que se utilizaron tenían un pequeño orificio donde se ajustó perfectamente el tubo de teflón, a través del cual pasaban los reactivos al sistema. Además, cada vez que se llenaban los recipientes con los reactivos, se les hacía pasar un flujo de nitrógeno, para eliminar la entrada de agua del ambiente. Adicionalmente a esto, alrededor de la tapa de cada recipiente se ponía teflón.

Todos los reactivos (metanol y RKF) se sonicaron en un baño de ultrasonido por aproximadamente 15 minutos antes de utilizarlos. Esto se hizo para evitar la presencia de burbujas, cuando se trabajaba con el sistema FIA. Para impedir que entrara agua en los reactivos al momento de sonicarlos, los orificios (10 mm d.i.) de la tapa de cada recipiente se taparon utilizando plastilina y la tapa se cubrió completamente con papel parafilm.

2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En este trabajo se compararon tres métodos estándar para cuantificar agua en muestras sólidas: 1) secado, 2) agitación magnética y 3) maceración; de acuerdo al método ASTM D1348-94 y la norma mexicana NMX-F-552-1998-SCFI^(24, 55) y se compararon con el sistema propuesto de extracción en continuo asistida con ultrasonido, en muestras de especias y de granos de café. A continuación se indica en qué consiste cada procedimiento.

2.3.1 Métodos de secado

El método de secado es diferente según el tipo de muestra que se analizó: especias o granos de café. Para cada muestra se hicieron tres extracciones con cada método.

2.3.1.1 Especias

Se realizó de acuerdo al método ASTM D-1348-94⁽⁴³⁾. El primer paso fue colocar un vaso de precipitados de 100 mL tapado con papel filtro previamente pesado, en

la estufa a 105 ± 3 °C durante dos horas. Posteriormente, se sacó el vaso con tapa y se dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador, cuando esto ocurrió se pesó en una balanza analítica. Este procedimiento se repitió hasta que el recipiente llegó a peso constante.

En el vaso de precipitados se pesó aproximadamente 1 g de muestra. A continuación se pesó la muestra en el vaso y con la tapa puesta. Se colocó el vaso con la muestra en la estufa y se le retiró la tapa, donde se mantuvo a 105 ± 3 °C durante 4 horas.

Cuando terminó el período de tiempo especificado, rápidamente se le colocó la tapa al vaso y se trasladó a un desecador, donde se enfrió a temperatura ambiente durante mínimo una hora; después se pesó nuevamente. El procedimiento completo de secado y pesado, se repitió hasta que la pérdida de masa entre dos pesadas sucesivas fue menor a 0.005 g (o hasta que hubo una ganancia de masa).

El cálculo del contenido de humedad se realizó, de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\text{Contenido de humedad} = \left[\frac{(M - D)}{(M - T)} \right] \times 100 \quad (5)$$

donde:

M = masa de la muestra original con el vaso y la tapa.

D = masa de la muestra seca.

T = masa del vaso y la tapa secos.

2.3.1.2 Café en grano

La pérdida de humedad de las muestras de café se hizo de acuerdo a la Normas Oficiales Mexicanas, NMX-F-552-1998-SCFI y NMX-149-SCFI-2001 ^(24, 25). En primer lugar se secó un vaso de precipitados con tapa hasta llegar a peso constante, de la misma forma que se indicó en el inciso anterior.

A continuación, se pesaron aproximadamente 5 g de la muestra en el vaso de precipitados seco y se tapó; en seguida, se pesó el vaso tapado y con la muestra. El vaso con la muestra se colocó en la estufa y se le retiró la tapa. La muestra se secó a 130 ± 3 °C, por 6 horas. Al final del período especificado, rápidamente se le colocó la tapa al vaso de precipitados y se puso en el desecador. Se dejó que el vaso con la muestra se enfriara durante 1 h y, posteriormente, se volvió a pesar. Con los datos obtenidos se calculó el contenido de humedad (P1) en los granos de café, utilizando la Ecuación 5. Después de determinar la masa, otra vez se colocó el vaso tapado en el desecador, por lo menos durante 15 h.

Nuevamente se repitió el procedimiento de secado de la muestra, a 130 °C \pm 3 °C durante 4 h. Cuando terminó este período de tiempo, se tapó el vaso, se colocó en un desecador durante 1 h y al final se pesó otra vez. Con los datos obtenidos, se calculó el contenido de humedad (P2) de acuerdo a la Ecuación 5. Normalmente la diferencia entre P1 y P2 debe ser inferior a 1.0 g por 100 g de muestra. Sino es así, es preciso repetir la determinación.

La humedad (P) del producto, expresada en porcentaje de masa, es igual a la pérdida de masa observada después del primer secado más la mitad de la pérdida de masa complementaria observada después del segundo secado. En la Ecuación 6 se muestra la fórmula para hacer el cálculo.

$$P = P1 + \frac{(P1 - P2)}{2} \quad (6)$$

2.3.2 Extracción con disolventes

Para cada muestra se hicieron tres extracciones con cada método, utilizando metanol como extractante; los resultados que se reportan son la media de las tres extracciones para cada muestra.

Lo único que se varió en cada método fueron las condiciones a las que se sometió la muestra con el extractante (metanol). En algunos casos fue necesario hacer

variaciones en la cantidad de muestra o de extractante que se utilizó, según el tipo de muestra.

Para cada procedimiento se utilizó aproximadamente 1 g de especias secas o granos de café molidos y 20 mL de metanol; pero en el caso de las vainas de vainilla beneficiada se utilizó 1 g de muestra con 40 mL de metanol. Para las hierbas o especias frescas, se tomaron 0.15 g de muestra y 20 mL metanol. Estas distinciones se hicieron de acuerdo al contenido de agua presente en la muestra.

A las muestras en el contenedor de polietileno se les hizo pasar un flujo de nitrógeno por 10 s y en seguida se taparon. El extractante se agregó a las muestras utilizando una bomba peristáltica. A continuación, el contenido del contenedor se sometió a alguno de los tres procesos de extracción: agitación magnética, maceración o ultrasonido.

La determinación del contenido de agua en cada una de las muestras se hizo utilizando la configuración FIA. A la absorbancia que se obtuvo con cada extracto, se le restó un blanco de metanol el cual se sometió al mismo proceso de extracción que el extracto de la muestra.

2.3.2.1 Extracción con agitación magnética

Al contenedor de polietileno o cámara de extracción con la muestra se le colocó un agitador magnético de 2 cm de largo. A continuación, el contenedor se colocó en una placa de agitación, donde se sometió a agitación magnética constante durante 30 minutos.

Cuando finalizó la extracción, el extracto se bombeó hacía otro contenedor perfectamente sellado, para evitar que restos de la muestra llegaran al sistema FIA y pudieran tapar la tubería. A partir del segundo contenedor, se inyectó el extracto de la muestra hacía el sistema FIA. En la figura 2.2, se muestra una ilustración de la extracción por agitación magnética o maceración acoplada al sistema FIA.

2.3.2.2 Extracción por maceración

Una vez que la cámara de extracción se encontraba cerrada y contenía a la muestra y al metanol, se dejó en reposo durante una hora, cada 20 minutos se agitó ligeramente. Al final del tiempo de extracción, el extracto de la muestra se bombeó hacia otro recipiente y de este segundo contenedor se inyectó al sistema FIA.

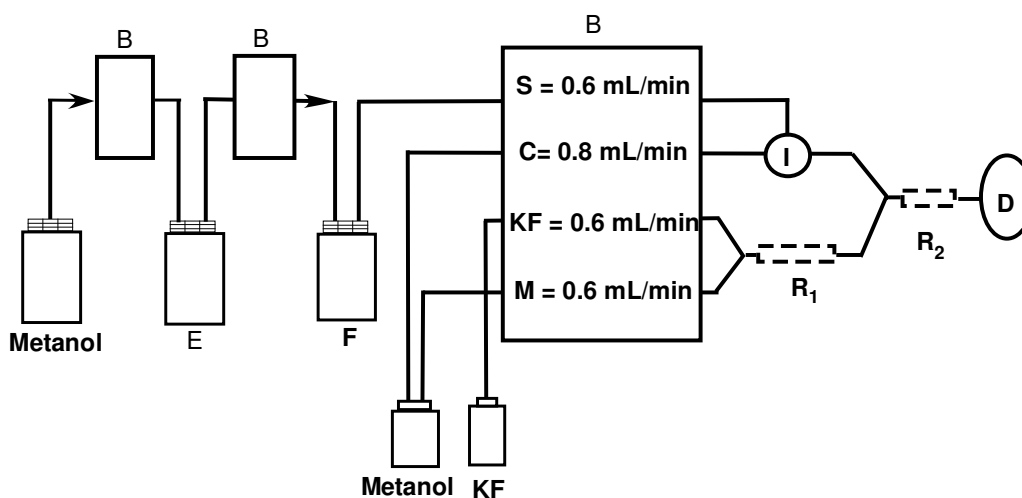


Figura 2.2 Configuración FIA acoplada a la extracción por agitación magnética o maceración. Donde B = bomba peristáltica, E = cámara de extracción (en reposo o agitación), F = contenedor de la muestra, KF = reactivo de Karl Fischer, S = muestra, C = portador, M = metanol, R₁ = reactor de dilución, R₂ = reactor de reacción, I = válvula de inyección, D = equipo de detección espectrofotométrica.

2.3.2.3 Extracción asistida con ultrasonido

Para llevar a cabo la extracción de agua en muestras con un contenido de agua menor al 12 %, se realizó el siguiente procedimiento. Este tipo de muestras fueron los granos de café y todas las especias secas, excepto las vainas de vainilla beneficiada. Se pesó 1 g de muestra en un recipiente de polietileno al que se le hizo pasar un flujo de nitrógeno y se agregaron 20 mL de metanol. Estas muestras se trataron bajo las siguientes condiciones: tiempo de irradiación 30 s, tiempo de no irradiación 10 s y una potencia de 260 W durante dos ciclos de extracción.

El mismo procedimiento de irradiación con ultrasonido se utilizó para las muestras de especias frescas, donde el contenido de agua es superior al 70 %, sólo que en este caso únicamente se usaron 0.15 g de muestra.

La extracción asistida con ultrasonido de las vainas de vainilla se hizo con 1 g de muestra y 40 mL de metanol dentro de la cámara de extracción, bajo las siguientes condiciones: tiempo de irradiación 30 s, tiempo de no irradiación 60 s y 260 W de potencia durante 6 ciclos de extracción.

En la figura 2.3 se muestra un esquema del sistema utilizado para acoplar la extracción asistida con ultrasonido a la configuración de flujo continuo, con la finalidad de automatizar todo el proceso.

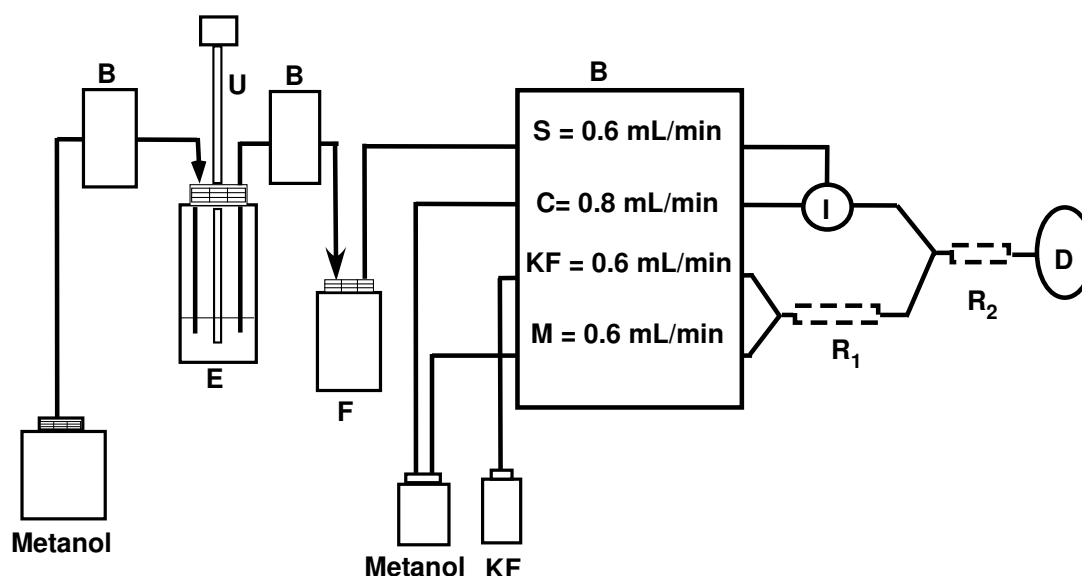


Figura 2.3 Configuración FIA acoplada a la extracción asistida con ultrasonido focalizado. Donde B = bomba peristáltica, U = punta de ultrasonido focalizado, E = cámara de extracción, F = contenedor de la muestra, KF = reactivo de Karl Fischer, S = muestra, C = portador, M = metanol, R₁ = reactor de dilución, R₂ = reactor de reacción, I = válvula de inyección, D = equipo de detección espectrofotométrica.

Al final del tiempo de extracción, la cámara de extracción se dejó reposar durante 1 minuto. En seguida, el extracto se bombeó hacia otro contenedor para posteriormente inyectarse al sistema FIA para su detección y posterior cuantificación.

En la figura 2.4 se muestra una foto de la configuración FIA acoplada a la extracción asistida con ultrasonido, utilizada para la determinación de agua.



Figura 2.4 Configuración FIA acoplada a la extracción asistida con ultrasonido focalizado

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existen muchos métodos para la determinación de agua en diferentes tipos de matrices, siendo los métodos más comunes el secado en estufa y la titulación con el reactivo de Karl Fischer (RKF). Aunque existen tres formas de medir el punto final de una titulación con el RKF: visual, espectrofotométrica y electroquímica, para este trabajo se utilizó la detección espectrofotométrica debido a la facilidad para acoplarla a un sistema de flujo, ya que para la medición electroquímica se requiere un electrodo e instrumental diseñado especialmente para esta medición.

3.1 ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL REACTIVO DE KARL FISCHER (RKF)

El primer paso fue conocer el espectro de absorción del RKF, para lo que se realizó un barrido de absorción de 300 nm a 800 nm. Cuando se hizo el barrido, se obtuvo una saturación de señal por lo cual fue necesario llevar a cabo varias diluciones del RKF con metanol. De esta forma se obtuvieron los espectros que se presentan en la figura 3.1, donde se ve que la longitud de onda máxima del RKF es de 460 nm, con una dilución aproximada de 1:3, mientras que a mayores diluciones el máximo se desplaza a menos de 400 nm, lo cual dificulta realizar la medición a esta longitud de onda debido a la gran cantidad de compuestos vegetales que absorben en esta zona.

En trabajos previos se han realizado lecturas a diversas longitudes de onda (550 nm, 620 nm y 625 nm) ⁽³⁵⁻³⁷⁾. En aquellos trabajos en que se ha hecho una dilución del RKF las lecturas se hicieron a 550 nm y 625 nm, obteniéndose los mejores resultados a 625 nm.

De acuerdo a los resultados de la figura 3.1 y a los resultados obtenidos en trabajos previos, se decidió trabajar con tres longitudes de onda (λ): 460 nm, 600 nm y 650 nm. Se utilizó 460 nm porque es la longitud de onda máxima a la que absorbe el RKF, mientras que las longitudes de onda de 600 nm y 650 nm se encuentran en la parte baja del espectro de absorción y por lo tanto se evita una saturación de la absorbancia en las señales de mayores concentraciones de agua.

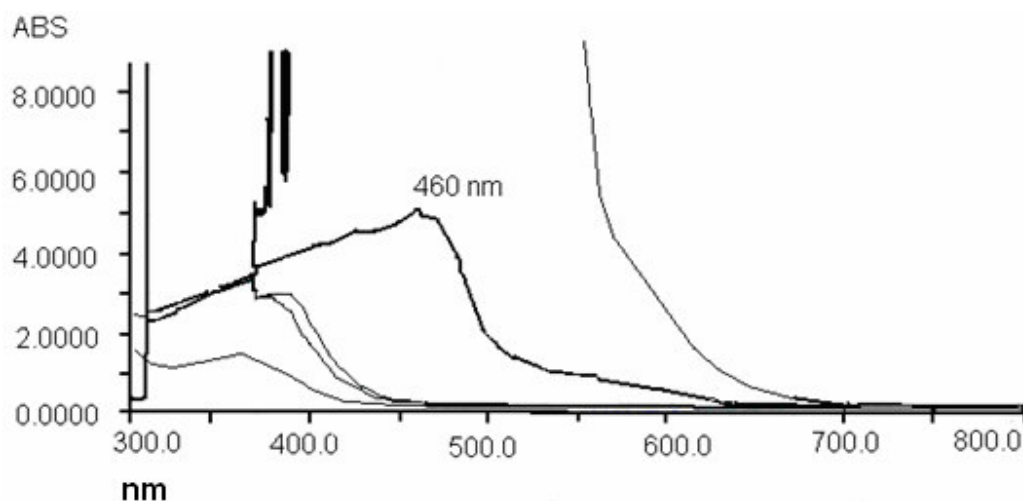


Figura 3.1 Espectro de absorción del reactivo de Karl Fischer

3.2 SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

La construcción del sistema FIA para la determinación de agua según la reacción de Karl Fischer se basó en trabajos previamente publicados ^(37, 60).

El sistema FIA consistió de un paso previo de dilución del RKF con metanol. Se ha demostrado que de esta forma aumenta el intervalo lineal de la curva y disminuye el límite de detección. Al hacer la dilución con metanol del RKF en línea, disminuyen los errores respecto a la dilución manual ⁽⁶⁰⁾. Por lo anterior en este trabajo dicha dilución se hizo en línea.

El RKF y el metanol se bombearon a un flujo de 0.6 mL/min para llegar al reactor de dilución de 160 cm (Figura 2.1). Posteriormente pasaron a un reactor de reacción de 200 cm donde confluyeron el RKF diluido con el portador (0.8 mL/min) y el bolo de muestra (0.6 mL/min).

Utilizando esta configuración se construyeron seis curvas de calibración con disoluciones de agua en metanol. Dichas curvas se realizaron con dos volúmenes de inyección de muestra (5 μ L y 46 μ L) y tres longitudes de onda (460 nm, 600 nm y 650 nm).

Para la longitud de onda de 460 nm, con un bucle de 5 μL o 46 μL , se obtuvo una saturación de la señal con disoluciones con concentraciones del 0.1 % al 5 % (v/v) de agua, por lo cual se descartó utilizar dicha longitud de onda.

La siguiente longitud de onda que se probó fue 650 nm, con dos volúmenes de muestra: 5 μL y 46 μL . Se inyectaron disoluciones con concentraciones del 0.2 % al 5 % (v/v) de agua en metanol. Sin embargo, con ambos volúmenes de inyección de muestra se obtuvieron señales muy pequeñas y similares en tamaño; a pesar de tratarse de disoluciones con concentraciones diferentes. Por este motivo se descartó utilizar esta longitud de onda. En la figura 3.2 se muestran las señales obtenidas al inyectar 5 μL de las diferentes disoluciones al sistema FIA para la determinación de agua leyendo a 650 nm.

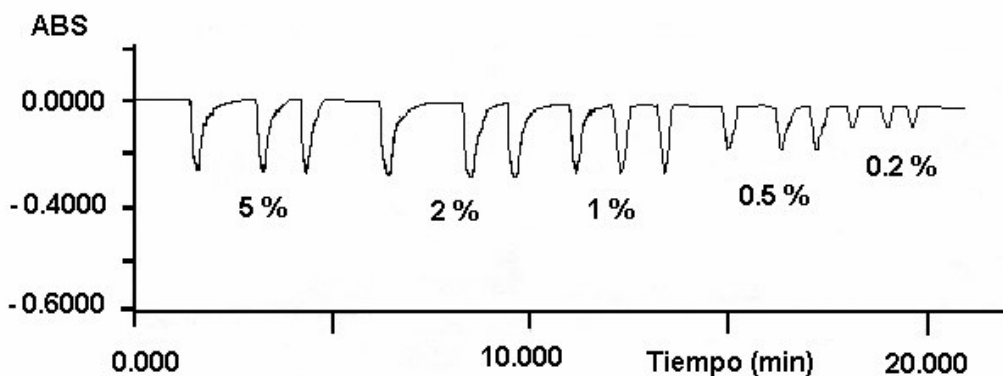


Figura 3.2 Diagrama del 0.2 % al 5 % (v/v) de agua en metanol por triplicado, con un volumen de muestra de 5 μL a 650 nm

Por último se construyeron dos curvas de calibración en un intervalo de concentración del 0.02 % al 2 % (v/v) de agua en metanol, leyendo a una longitud de onda de 600 nm, con dos volúmenes de inyección: 5 μL y 46 μL . Con ambos volúmenes de inyección se consiguieron buenas señales, por lo tanto con cada volumen de muestra se ajustó la curva de calibración a la ecuación de la recta.

La curva de calibración que se construyó utilizando un volumen de inyección de 46 μL , tuvo un intervalo lineal de 0.05 % a 0.64 % (v/v) de agua en metanol, con la

siguiente ecuación lineal: $A = 4.3673 (\pm 0.2427) [\% \text{ H}_2\text{O v/v}] - 0.1114 (\pm 0.0943)$, donde A es el valor de la absorbancia. El coeficiente de regresión fue de 0.9944.

La curva de calibración en la que se utilizaron 5 μl de muestra generó la siguiente ecuación de la recta: $A = 0.9264 (\pm 0.0159) [\% \text{ H}_2\text{O v/v}] - 0.0092 (\pm 0.0071)$, donde A es el valor de la absorbancia, con un intervalo lineal de 0.05 % a 0.8 % (v/v) de agua en metanol y un coeficiente de correlación de 0.9993. En la figura 3.3 se muestra el diagrama que se utilizó para generar dicha ecuación.

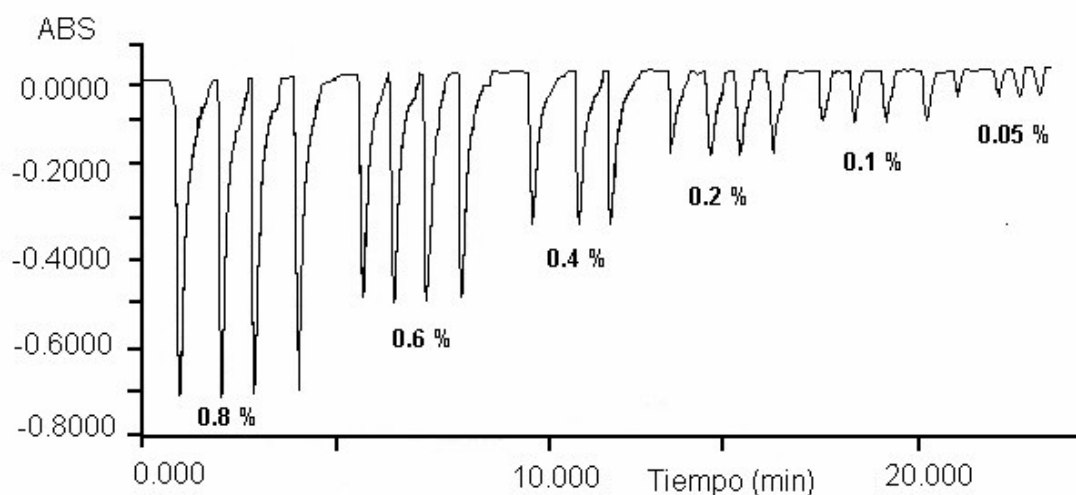


Figura 3.3 Diagrama de 0.05 % a 0.8 % (v/v) de agua en metanol con un volumen de muestra de 5 μl a 600 nm

De acuerdo a las características de estas dos últimas curvas se tomó la decisión de utilizar 5 μL como volumen de inyección de la muestra, ya que con 5 μL se obtuvo un intervalo lineal más amplio y con un mejor coeficiente de correlación que con 46 μL , posiblemente, porque cuando se inyectan 46 μL de muestra el sistema se satura más rápido, a pesar de que la ecuación de la recta obtenida con 46 μL presentó una mejor pendiente y por lo tanto una mejor sensibilidad.

Una de las ventajas del sistema FIA es que entre el tiempo de inyección y el tiempo que tarda en salir la señal y en regresar a la línea base, se necesitan menos de 1.5 minutos. Como típicamente se hacen tres inyecciones para el análisis de cada extracto o estándar y el resultado que se reporta es un promedio

de las tres inyecciones, el tiempo de análisis de un extracto o estándar por triplicado es tan sólo de 4.5 minutos.

El sistema FIA que se construyó para la cuantificación de agua en disoluciones en metanol utilizando el reactivo de Karl Fischer, consistió de un paso previo de dilución del RKF (0.6 mL/min) con metanol (0.6 mL/min) en un reactor de dilución de 160 cm, seguido de un reactor de reacción de 200 cm donde confluyen el portador (0.8 mL/min) y el RKF diluido, utilizando 5 μ L como volumen de inyección de la muestra (0.6 mL/min) y leyendo a una longitud de onda de 600 nm. Dicha configuración se mostró en la figura 2.1.

3.2.1 Límite de detección y de cuantificación

El límite de detección (LD) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y - y_B = 3 s_B \quad (7)$$

Donde “ y ” corresponde a la respuesta calculada para determinar el límite de detección; “ y_B ” es la ordenada al origen y el dato estadístico s_B corresponde a la desviación estándar de los residuos de “ y ”. Además, se utilizó la ecuación de la recta para despejar el valor de la concentración del analito o límite de detección, que corresponde a la respuesta calculada “ y ”.

Para el cálculo del límite de cuantificación (LC) se tomó en cuenta la misma ecuación, con la única variante de que se utiliza 10 veces el valor de s_B en lugar de 3⁽⁶¹⁾.

Los límites de detección y cuantificación calculados, fueron respectivamente: 0.03 % y 0.08% (v/v) de agua. En la figura 3.4, se muestran las características de la curva de calibración que se utilizó en este trabajo.

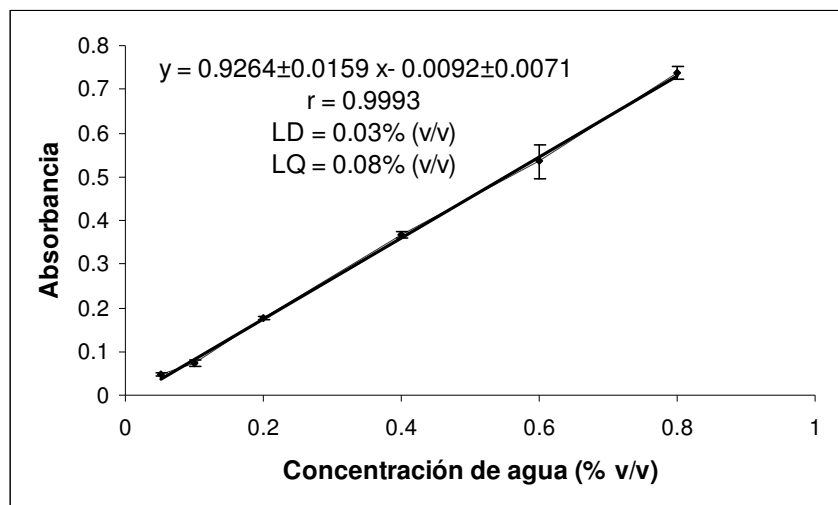


Figura 3.4 Curva de calibración final

3.2.2 Evaluación del sistema FIA

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio, de igual forma se determinó su exactitud. Esta evaluación requiere de contar con un estándar de preferencia certificado, o bien comparar el método propuesto contra otro método.

3.2.2.1 Repetibilidad y reproducibilidad

Al principio se pensó en utilizar un estándar certificado de tartrato de sodio dihidratado; sin embargo, este compuesto no se pudo disolver completamente en metanol, por lo tanto no se obtuvieron resultados reproducibles al inyectarlo al sistema FIA, además de que contribuyó a tapar las tuberías del sistema.

La siguiente opción fue buscar estándares certificados de agua en disolución. Aunque existen varias opciones en el mercado, en concentraciones al 5 %, 1 % y 0.1 % de agua, ninguno de estos se podía usar sin dilución para evaluar nuestro sistema, ya que los dos primeros (5 % y 1% de agua) están fuera del intervalo lineal de nuestra curva y el estándar de 0.1% corresponde a la parte baja de la curva. Lo más conveniente es utilizar estándares que se encuentren en la parte media de la curva de calibración, esto es al 0.4%.

Por esta razón fue necesario hacer una dilución con el estándar de agua Hydranal® 10.0, número de referencia 34849 (10.04 ± 0.02 mg de agua, $n = 20$) trazable a NIST SRM 2890, cuya concentración de agua es del 1 % (v/v). Del estándar Hydranal® 10.0 se prepararon dos disoluciones estándar al 0.4 % (v/v) diariamente en metanol. La disolución preparada diariamente, se inyectó por triplicado durante siete días ^(58, 62). En la Tabla 3.1, se muestran los resultados obtenidos con los cuales se realizó un análisis de varianza.

Tabla 3.1 Resultados de la determinación de la reproducibilidad y repetibilidad, expresados como % (v/v) de agua

Día	Replica 1	Replica 2
1	0.401	0.384
2	0.395	0.385
3	0.398	0.385
4	0.388	0.398
5	0.384	0.407
6	0.396	0.402
7	0.394	0.393

En la Tabla 3.2 del análisis de varianza (ANOVA) se muestran la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y las medias de cuadrados (MC) entre días y dentro de días.

Tabla 3.2 Análisis de varianza (ANOVA)

Concentración	Fuente	SC	GL	MC
0.4 % (v/v)	Entre días	9.38×10^{-5}	6	1.56×10^{-5}
	Dentro de días	0.007	7	9.77×10^{-5}
	Total	1.274	13	---

La variación entre días o repetibilidad (s_r^2) se determinó tomando en cuenta que s_r^2 es igual a la media de cuadrados dentro de días.

Mientras que para calcular la reproducibilidad dentro del laboratorio (s_{WR}^2), se determinó de acuerdo a las Ecuaciones 8 y 9, donde n_j es el número de réplicas por día

$$s_{entre}^2 = (MC_{entre} - MC_{dentro}) / nj \quad (8)$$

y sr^2 es la media de cuadrados dentro de días ^(58, 61).

$$s_{WR}^2 = s_r^2 + s_{entre}^2 \quad (9)$$

La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa fueron del 2.43 % y 2.99 % respectivamente. Estos resultados demuestran que el sistema FIA propuesto es adecuado para la determinación de agua, con una buena precisión.

3.2.2.2 Exactitud

Para determinar la exactitud del método se utilizaron las mismas mediciones realizadas para conocer la precisión. Para conocer la exactitud del método, se comparó el promedio de los valores obtenidos en la Tabla 3.1 contra el valor certificado del estándar. Finalmente, podemos concluir que la exactitud del método es del 98.00 %, por lo tanto el método propuesto resulta exacto en las determinaciones de agua.

3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para realizar la extracción de agua de las muestras se decidió utilizar métodos que se han reportado previamente ^(1, 34, 42, 43, 63), en éstos la extracción de agua en matrices vegetales se ha hecho utilizando como disolvente metanol. Los métodos que más se han empleado para realizar la extracción, son la agitación manual o con agitador magnético, el uso de un homogeneizador puede sustituir a la agitación, o bien la extracción por reposo o maceración.

De acuerdo al método ASTM D 1348-94 ⁽⁴³⁾, para muestras con un contenido de agua del 4 % al 6 %, se debe pesar de 2.5 g a 3.0 g de la muestra y agregar 100 ml de metanol. A continuación, se agita por 25 minutos o se deja en reposo por 1 hora. Tomando como referencia dicho método, en este trabajo se busca la disminución de la cantidad de disolventes que se utilizan para la extracción de la muestra y la realización de la extracción en línea. Por lo tanto, se hicieron diversas

pruebas utilizando como muestra perejil seco y probando diferentes volúmenes de metanol. Para la cuantificación de la extracción de agua se utilizó el sistema FIA construido.

3.3.1 Optimización para la extracción por maceración y con agitación magnética

En primer lugar se probó la extracción por agitación manual, sin embargo no resultó reproducible; en este sentido se prefirió utilizar la agitación magnética, la cual generó resultados mucho más reproducibles en tiempos de 30 min, aunque se probaron tiempos de 30, 40 y 60 minutos no se encontró diferencia apreciable entre ellos.

Con respecto a la extracción por reposo o maceración, dicho procedimiento se realizó según el método ASTM D 1348-94⁽⁴³⁾ que indica 1 hora.

3.3.1.1 Volumen de metanol y cantidad de muestra

A continuación se optimizaron la cantidad de muestra y el volumen de metanol. Se utilizaron cámaras de extracción de polietileno de 60 ml (9 cm x 4 cm).

Los primeros experimentos se hicieron con 1 g y 0.5 g de perejil seco y con 10 mL, 15 mL y 20 mL de metanol. Al llevar a cabo las diferentes extracciones se notó que para 1 g de muestra era necesario utilizar por lo menos 15 mL de metanol, para cubrir totalmente la muestra, sin embargo, para una mejor extracción el volumen óptimo fue de 20 mL.

En cuanto a los experimentos que se realizaron con 0.5 g de muestra no se obtenían resultados reproducibles, con ninguno de los tres volúmenes, debido a la cantidad de muestra utilizada y a su bajo contenido de agua. De esta forma se escogió 1 g de muestra y 20 ml de metanol como las condiciones óptimas para realizar la extracción.

3.3.2 Optimización de la extracción asistida con ultrasonido (EAU)

Con el fin de mejorar los métodos de extracción estándar se optimizó la EAU de agua en muestras de especias y granos de café.

3.3.2.1 Extracción en línea indirecta con ultrasonido

En un principio se probó con una columna de vidrio de 4 cm x 2 cm, fabricada con una entrada y una salida para el paso de disolvente a través de una tubería de teflón. Dentro de ésta se colocó la muestra de perejil seco. Se utilizaron dos válvulas de inyección, con el objetivo de construir un sistema abierto-cerrado y hacer pasar el metanol a través de la columna para extraer el agua de la muestra aplicando de 1 a 5 ciclos de extracción. Inicialmente, para que la muestra estuviera expuesta a la radiación de ultrasonido, la columna se colocó en un baño de agua, cerca de la punta del ultrasonido focalizado. Al final del tiempo de extracción, se abrió el sistema y el extracto se inyectó en la configuración en flujo. Sin embargo, con este arreglo no se obtuvieron mejores resultados que cuando se realizó el mismo procedimiento sin aplicar el ultrasonido, en ambos casos no fue posible cuantificar la cantidad de agua extraída de la muestra.

Aunque en un inicio parecía una buena opción, ya que se han reportado buenos resultados con sistemas de extracción similares ⁽⁵⁸⁾, para el propósito de este trabajo no fue así. En los siguientes párrafos se resumen los problemas que se enfrentaron.

La cantidad de muestra que se podía colocar en la columna no era mayor a 0.07 g y el paso del metanol a través de la muestra no era uniforme, por lo cual no se tenía una buena extracción. Para evitar la salida de muestra junto con su extracto y no tapar las tuberías, se utilizaron filtros de algodón y de papel filtro en los extremos de la columna, sin embargo, no fueron exitosos, ya que también favorecían la presencia de burbujas.

Otro de los problemas fueron los espacios de aire provocados por la muestra en la columna, en los que existía humedad del medio ambiente, lo que se solucionó haciendo pasar nitrógeno por la columna.

Debido a estos problemas se buscó una configuración diferente para la extracción, donde se suprimiera la formación excesiva de burbujas y se pudiera trabajar con mayor cantidad de muestra y de disolvente.

3.3.2.2 Pruebas para la extracción

En busca de una mejor forma de llevar a cabo la extracción asistida con ultrasonido, se optimizaron las condiciones de trabajo, utilizando los mismos volúmenes, cantidades de muestra y recipientes que para los otros dos procedimientos (maceración y agitación magnética), de tal forma que se pudieran comparar los resultados entre métodos.

3.3.2.2.1 Cámaras de extracción para la EAU

Se utilizaron recipientes de polietileno o cámaras de extracción de 60 ml (9 cm x 4 cm), en los cuales se podía adaptar la punta del ultrasonido y las tuberías de entrada y salida del disolvente.

En un inicio se envolvió la muestra en papel filtro, antes de colocarla en la cámara de extracción y a continuación se agregó el metanol, para evitar el paso de muestra por la tubería del sistema. Pero se encontraron dos dificultades: 1) el papel adsorbía demasiado metanol, por lo cual era necesario utilizar casi el doble de volumen que sin papel; 2) para poder utilizar el papel filtro, se tenía que secar por cuatro horas para eliminar el agua. Esto dificultaba el proceso de extracción, por lo que se eligió realizar la extracción sin papel filtro.

3.3.2.3 Diseño de experimentos para optimizar la EAU

3.3.2.3.1 Experimentos preliminares

Para efectuar la optimización de la extracción asistida con ultrasonido se utilizaron 20 mL de metanol y 1 g de perejil seco. Se utilizó perejil debido a su disponibilidad en el mercado, precio y a que su contenido de agua es similar al de la mayoría de las especias estudiadas. La punta de titanio del equipo se sumergió aproximadamente 1 cm en el metanol con la muestra, dentro de la cámara de extracción de tal forma que la radiación llegará directamente sobre la muestra.

Los primeros experimentos que se llevaron a cabo fueron con la potencia (W) y el tiempo de irradiación (s). Se utilizaron potencias de 80 W, 160 W y 240 W con tiempos de irradiación de 30 s y 60 s. En la figura 3.5 se muestran los resultados obtenidos en estos experimentos.

De acuerdo a la figura 3.5 los dos tiempos de extracción que se probaron, 30 s y 60 s, no mostraron diferencia notoria en la cantidad de agua extraída utilizando la misma potencia, a excepción de 160 W, donde la diferencia en la extracción fue superior a 0.75 % cuando el tiempo de extracción fue de 60 s. A pesar de que el equipo es capaz de trabajar hasta con 400 W, cuando se utiliza la micropunta de titanio no se deben superar los 280 W, en estos experimentos se utilizó un valor máximo de 240 W, con el que se obtuvieron los mejores resultados para ambos tiempos de irradiación. Sin embargo, el calentamiento de la cámara de extracción para el caso de 60 s de irradiación fue 10 °C superior que con 30 s, por esta razón se escogió 30 s como tiempo de irradiación óptimo.

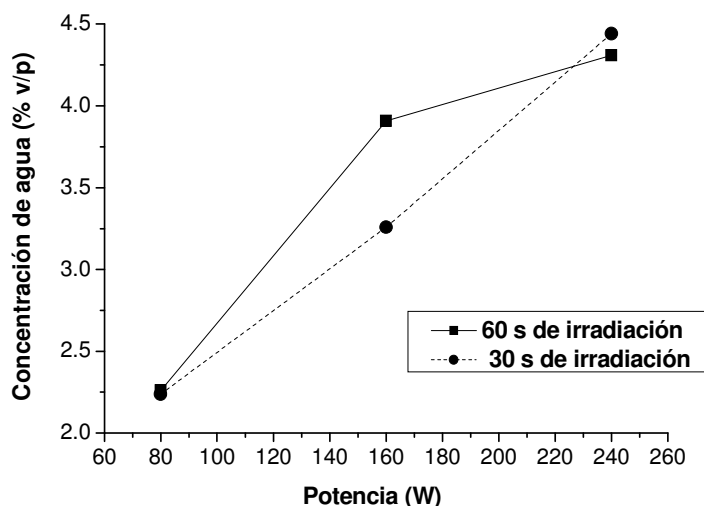


Figura 3.5 Primeras pruebas de la extracción asistida con ultrasonido

3.3.2.3.2 Diseño factorial 2^3

Una vez que se conoció el comportamiento del tiempo de irradiación y potencia, se desarrolló un diseño factorial 2^3 para obtener los parámetros óptimos de: tiempo de no irradiación, potencia y número de ciclos que se debían aplicar en la extracción.

Para la extracción asistida con ultrasonido es común utilizar ciclos de extracción que consisten en tiempos de irradiación y no irradiación; por lo cual dicho parámetro se incluyó en este diseño, en un intervalo de 2 a 5, ya que los valores con 1 ciclo ya se conocían. El intervalo de tiempo de no irradiación (t_n) fue de 10 s

a 60 s, dicho intervalo no puede ser mayor por el diseño del equipo. Se decidió utilizar potencias de 160 W a 260 W, donde 260 W se consideró el máximo que se podía utilizar sin dañar el equipo de ultrasonido; aunque ya se había visto que a una potencia de 240 W se obtenían los mejores resultados, se evaluaron potencias menores, puesto que en este diseño se incluyó más de un ciclo de extracción.

Con estos intervalos en los parámetros de estudio se realizó el estudio factorial. Como herramienta estadística para elaborar el diseño y posteriormente el análisis de varianza se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 2.1 para Windows. El modelo experimental consistió de tres factores de entrada y uno de salida, que es la absorbancia o concentración de agua calculada. Se eligieron tres puntos centrales con el fin de determinar la precisión del método vía un análisis de varianza.

Al introducir los parámetros de estudio, el programa determinó 11 experimentos definiendo los 3 parámetros de entrada para cada experimento y el orden aleatorio en el que se debían de llevar a cabo. En la Tabla 3.3 se presentan el orden en que se realizaron los experimentos y los resultados que se obtuvieron. Todos los experimentos se realizaron en un día y la determinación del contenido de agua en cada extracto se hizo con el sistema FIA propuesto.

Tabla 3.3 Experimentos del Diseño Factorial

Experimento	Potencia (W)	Tiempo no irradiación (s)	Ciclos	H ₂ O (% v/p)	Tiempo total de extracción
1	212	35	4	3.829	4 min 20 s
2	260	10	2	4.135	1 min 20 s
3	160	10	2	3.358	1 min 20 s
4	160	60	5	3.172	7 min 30 s
5	212	35	4	3.598	4 min 20 s
6	260	60	5	4.154	7 min 30 s
7	260	60	2	3.347	3 min
8	160	60	2	3.227	3 min
9	260	10	5	3.642	3 min 20 s
10	212	35	4	3.631	4 min 20 s
11	160	10	5	3.380	3 min 20 s

3.3.2.3.3 Análisis de varianza (ANOVA)

Para estimar los efectos que tenía cada uno de las variables estudiadas en la eficiencia de la extracción de agua en perejil se realizó un estudio de ANOVA. En la Tabla 3.4 se muestran los resultados del ANOVA.

El ANOVA mostró que la variable que más afectaba la eficiencia de extracción era la potencia, donde el valor de p fue menor a 0.05 a un nivel de confianza del 95 %, mientras que el tiempo de no irradiación y el número de ciclos no fueron estadísticamente significativos. Además los efectos estimados para cada factor en este modelo no muestran una relación directa entre ellos.

Tabla 3.4 Análisis de Varianza

Variable	Suma de cuadrados	GL	Medias de cuadrado	F	Valor de p
A: potencia	5.3411×10^{-5}	1	5.3411×10^{-5}	7.83	0.0489
B: tn	8.45×10^{-7}	1	8.45×10^{-7}	0.12	0.7426
C: ciclos	4.8789×10^{-6}	1	4.837×10^{-6}	0.72	0.4453
AB	1.62×10^{-6}	1	1.62×10^{-6}	0.24	0.6515
AC	4.4839×10^{-6}	1	4.483×10^{-6}	0.71	0.4470
BC	1.8605×10^{-5}	1	1.861×10^{-5}	2.73	0.1739
Error total	2.7276×10^{-5}	4	1.91×10^{-6}		

GL: grados de libertad

Las mejores extracciones de agua en muestras de perejil seco se obtuvieron en los experimentos 2 y 6, con 4.1 % (v/p) de agua. En ambos experimentos se utilizaron 260 W de potencia. Se escogió el experimento número 2, ya que es el que implica un menor tiempo de análisis, sólo 1 min 20 s, además de que causa menor calentamiento en la cámara de extracción y de la punta del ultrasonido que el experimento número 6, donde también se requiere de mayor tiempo de extracción (7 min 30 s). Tomando en cuenta esto fue como se eligieron las condiciones óptimas de extracción: potencia 260 W, tiempo de no irradiación 10 s, tiempo de irradiación 30 s y 2 ciclos de extracción.

3.3.2.4 Experimentos para la extracción de agua en vainilla beneficiada utilizando EAU

3.3.2.4.1 Primeros experimentos

Las condiciones del experimento número 2 se consideraron las adecuadas para las muestras de perejil seco y se utilizaron para las demás especias analizadas, donde el contenido de agua determinado se encontraba entre el 2 % (v/p) y 5 % (v/p). Sin embargo el contenido de agua en las vainas de vainilla beneficiadas se sabía que era superior, por lo cual se probó la extracción de agua con las condiciones de los experimentos número 2 y 6 por triplicado, ya que en el diseño factorial ambos experimentos dieron resultados muy similares.

En ambos experimentos se obtuvieron absorbancias superiores al último punto de la curva de calibración; por lo cual se duplicó el volumen de metanol de tal forma que la concentración de agua en el extracto cayera en la parte central de la curva, así que se trabajó con 1 g de muestra en 40 mL de metanol. Se decidió duplicar la cantidad de volumen de metanol en lugar de dividir en dos la cantidad de muestra, puesto que 0.5 g de vainas de vainilla beneficiada no es una cantidad representativa de la muestra, por la constitución de la misma (vainas y semillas). En las extracciones por maceración y agitación magnética también se utilizó 1 g de muestra con 40 mL de metanol, ya que la cantidad de agua en el extracto también fue superior al último punto de la curva de calibración cuando se utilizaron 20 mL de metanol.

En las tres extracciones asistidas con ultrasonido a una potencia de 260 W, durante dos ciclos de extracción, cada uno de 30 s de irradiación y 10 s de no irradiación (experimento número 2), con 40 mL de metanol y 1 g de muestra se obtuvo un promedio de 14.21 ± 0.84 % (v/p) de agua, mientras que para las extracciones asistidas con ultrasonido a una potencia de 260 W, durante 5 ciclos de irradiación, cada uno de 30 s de irradiación y 60 s de no irradiación (experimento número 6), con 40 mL de metanol y 1 g de muestra se obtuvo un promedio de 17.04 ± 1.54 % (v/p). Por tanto, se llevaron a cabo experimentos

adicionales para este tipo de muestra aumentando el número de ciclos de extracción.

A partir de las condiciones del experimento número 6 se aumentaron los ciclos de extracción; se evitó el calentamiento de la cámara de extracción gracias a que se utilizaron 60 s como tiempo de no irradiación, a diferencia de las condiciones del experimento número 2, donde el tiempo de no irradiación es sólo de 10 s, lo cual favorece el calentamiento de la cámara de extracción.

3.3.2.4.2 Optimización del número de ciclos de extracción

3.3.2.4.2.1 Cuantificación de la extracción de agua en vainas de vainilla beneficiada después de cada ciclo de extracción

El primer ensayo consistió en someter 1 g de muestra con 40 mL de metanol a un sólo ciclo de extracción, a continuación se bombearon 3 mL del extracto a una probeta sellada, a partir de la cual se inyectó al sistema FIA. Posteriormente, la misma muestra se sometió a otro ciclo de extracción, nuevamente se aspiraron 3 mL del extracto y se inyectó en el sistema FIA. Este procedimiento se continuó hasta llegar a 11 ciclos de irradiación. En la figura 3.6 se muestra la cantidad de agua extraída al ir aumentando los ciclos de irradiación en una misma muestra.

De acuerdo a los resultados de este experimento, las mejores extracciones se obtienen con 5 y 6 ciclos de irradiación. El rendimiento de la extracción con menos de 5 ciclos es mucho menor que para valores de 5 ó más ciclos. Cuando se aplican de 6 a 9 ciclos la cantidad de agua extraída de la muestra se mantiene constante, por lo cual se pueden considerar 6 ó 5 ciclos como las mejores opciones. Mientras que a partir de los diez ciclos de extracción la cantidad de agua extraída disminuye, posiblemente porque parte del agua se evapora debido al calentamiento de la cámara de extracción y por lo tanto no se puede cuantificar.

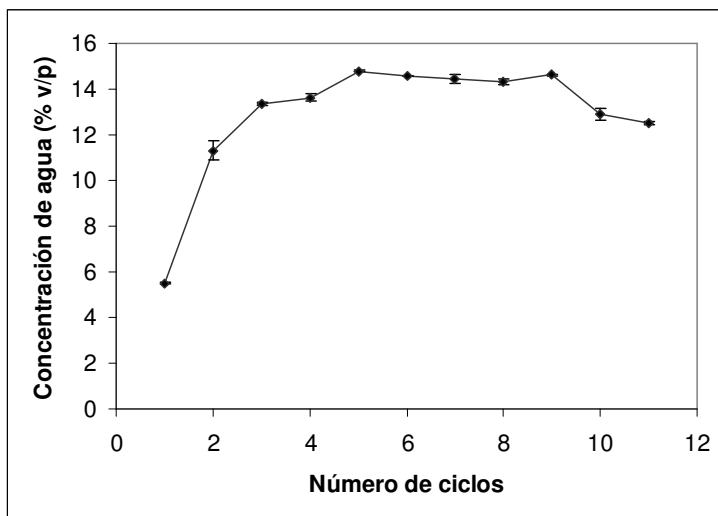


Figura 3.6 Eficiencia de extracción de agua en 1 g de vaina de vainilla beneficiada aumentando los ciclos de irradiación

3.3.2.4.2 Extracción de agua en vainas de vainilla beneficiada después de un número completo de ciclos de extracción

Para confirmar los resultados del primer experimento, se cuantificó el agua en la vainilla después de realizar 2, 5, 6, 8 y 10 ciclos completos de extracción. Con los resultados obtenidos se construyó la gráfica de la figura 3.7. De acuerdo a esta figura podemos ver que cuando se realiza la extracción de agua con un número de ciclos completos de extracción, los resultados son ligeramente diferentes a cuando se toma una lectura después de cada ciclo de irradiación, como en la figura 3.6.

En la figura 3.7 los mejores resultados se obtienen con seis ciclos de extracción y cuando el número de ciclos aumenta se reduce la cantidad de agua en el extracto. La reducción de agua a mayor número de ciclos se puede atribuir al calentamiento de la muestra y el metanol, entonces parte del agua extraída se encontraría en forma de vapor, no en el extracto por lo tanto no se puede cuantificar; a diferencia de cuando los ciclos no se hacen continuos y se da suficiente tiempo entre ciclos de extracción para que la muestra en la cámara de extracción se enfríe.

De esta forma el número de ciclos óptimos para la extracción de agua en vainas de vainilla beneficiada es de 6.

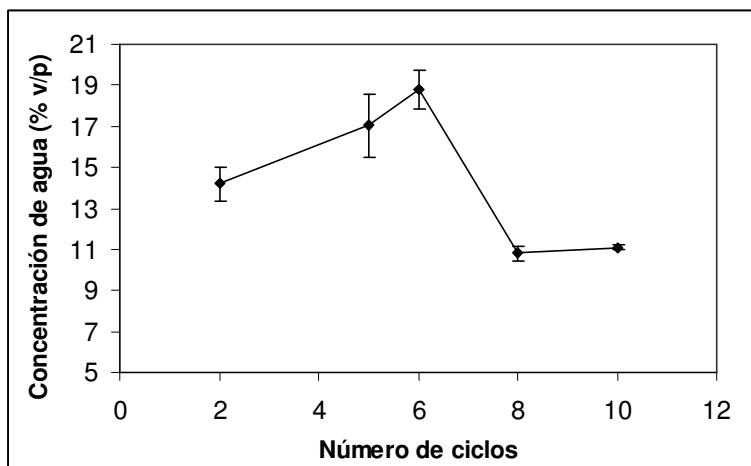


Figura 3.7 Eficiencia de extracción por triplicado en vainas de vainilla beneficiadas aumentando los ciclos de extracción

3.3.2.4.3 Verificación del volumen de metanol para la EAU en vainas de vainilla beneficiada

Para asegurar que 40 mL de metanol eran suficientes para extraer el agua de la vainilla beneficiada se sometió 1 g de vainas con 40 mL de metanol a seis ciclos de irradiación, cada uno con 30 s de irradiación y 60 s de no irradiación a 260 W. Cuando finalizó la extracción se retiró la mayor parte del metanol de la cámara de extracción utilizando una bomba peristáltica. A continuación se agregaron 20 mL metanol y se sometieron nuevamente a 6 ciclos de irradiación, posteriormente se retiraron los 20 mL de metanol y se agregaron otros 20 mL de metanol, los cuales se sometieron nuevamente a la extracción. Esto se repitió cuatro veces y en los cuatro extractos se midió el contenido de agua con el sistema FIA propuesto. En la figura 3.8 se muestran los resultados obtenidos.

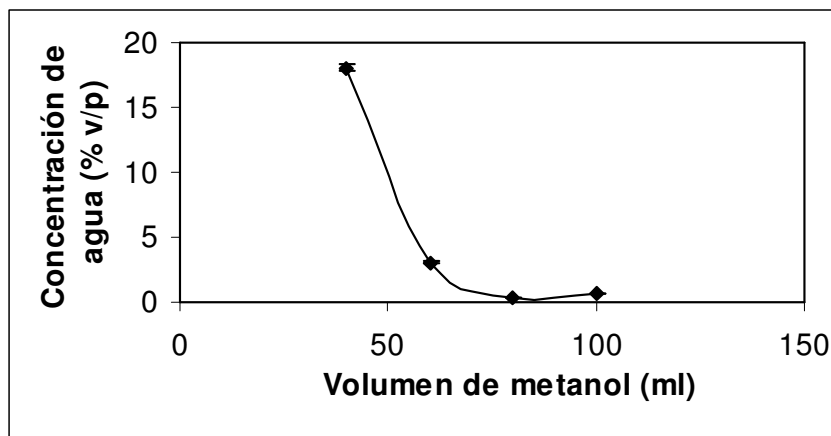


Figura 3.8 Extracción de agua en 1 g de vainas de vainilla beneficiada cambiando el extractante

De acuerdo a la figura 3.8 se concluye que 40 mL de metanol es un valor óptimo para realizar este tipo de extracción puesto que con este volumen se extrae la mayor cantidad de agua en la muestra. Aunque en la segunda extracción se obtiene poco menos del 3 % (v/p) de agua, esto se atribuye al extracto que queda en la cámara de extracción después de la primera extracción y que no se pudo retirar. En las dos últimas extracciones la cantidad de agua cuantificada es despreciable.

Tomando en cuenta los resultados de los tres experimentos, las mejores condiciones para la extracción de agua en vainas de vainilla son: 1 g de muestra en 40 mL de metanol, durante 6 ciclos de extracción, donde cada ciclo consiste en 30 s de irradiación con ultrasonido focalizado a 260 W y 60 s de no irradiación.

3.3.2.5 Evaluación de la extracción de agua en flor de jamaica

Al realizar la extracción por triplicado en flor de jamaica durante 2 ciclos de extracción, con 30 s de irradiación a 260 W y 10 s de no irradiación para 1 g de muestra y 20 mL de metanol, se obtuvo 10.11 ± 0.18 % v/p de agua. Debido a que el contenido de agua en esta muestra era superior al resto de las especias, a excepción de las vainas de vainilla beneficiada, se decidió probar con las mismas condiciones que para la vainilla beneficiada por triplicado, con lo que se obtuvo 10.78 ± 0.91 % v/p de agua.

En ambos experimentos los resultados fueron muy similares, obteniéndose un promedio de 10.45 ± 0.69 % v/p de agua, por lo que se consideró que no existía diferencia entre las dos condiciones de extracción de agua en muestras de flor de jamaica. Así que se eligieron las condiciones del primer experimento, ya que se requiere únicamente de 1 minuto 20 s para realizar la extracción de agua en esta muestra.

De acuerdo a los experimentos realizados se concluyó que para muestras cuyo contenido de agua fuera superior al 12 % (v/p), era necesario utilizar 1 g de muestra con 40 mL de metanol y realizar la extracción durante 6 ciclos, cada uno de 60 s de irradiación y 30 s de no irradiación a 260 W. Mientras que para muestras con un contenido menor al 12 % (v/p) de agua, era suficiente con utilizar 1 g muestra en 20 mL de metanol durante 2 ciclos de extracción, cada uno de 30 s de irradiación y 10 s de no irradiación a 260 W. El valor del 12 % (v/p) es un valor aproximado porque ninguna de las muestras analizadas tuvieron valores entre 12 % y 18 % (v/p) de agua, pero para asegurar la eficiencia de extracción se seleccionó este criterio.

3.3.2.6 Influencia de la energía de ultrasonido en disoluciones de agua en metanol

Con la intención de saber si la irradiación con ultrasonido afecta la concentración de agua en las muestras, se determinó la concentración de dos disoluciones de metanol en agua al 0.4 % y 0.16 % (v/v) utilizando el sistema FIA construido. Posteriormente, se tomaron 20 mL de cada una de estas disoluciones y se sometieron a la irradiación con ultrasonido durante 2 y 6 ciclos de extracción de acuerdo a los procedimientos previamente mencionados.

Relacionando las absorbancias obtenidas antes y después de someter las dos disoluciones a la irradiación con ultrasonido, se calculó el porcentaje de recobro. Cuando se aplicaron 6 ciclos de extracción los recobros fueron del 99 % para la disolución con 0.4 % (v/v) de agua y del 99.8 % para la disolución del 0.16 % (v/v) de agua. Para el caso de 2 ciclos de irradiación los recobros fueron del 102 % para la disolución con 0.4 % (v/v) de agua y del 106 % para la disolución del 0.16

% (v/v) de agua. Estos resultados demostraron que la concentración de agua no cambia por la aplicación de energías de ultrasonido y, por lo tanto, se puede utilizar para realizar este tipo de extracciones.

3.3.2.7 Precisión de la extracción de agua con ultrasonido en muestras de especias

Para evaluar la precisión del método de extracción, se realizaron siete extracciones en muestras de perejil seco y vainas de vainilla ya que no se encontraron estándares certificados para determinar agua en especias. La extracción de agua se hizo según las condiciones que se han considerado las más adecuadas para la extracción asistida con ultrasonido de acuerdo al tipo de muestra. La cantidad de agua en cada extracto se midió por triplicado en el sistema FIA propuesto.

Los resultados de la Tabla 3.5 muestran que el sistema propuesto para la extracción de agua asistida con ultrasonido en especias secas tiene una buena precisión entre muestras con diferente contenido de agua como el perejil seco y las vainas de vainilla beneficiada. Por lo que este método de extracción resulta preciso para este tipo de extracciones bajo las condiciones utilizadas en muestras dentro de este intervalo de concentraciones.

Tabla 3.5 Precisión en la extracción de agua en perejil y vainas de vainilla beneficiada utilizando la EAU

Replica	Perejil seco	Vainas de vainilla beneficiada
	Concentración de agua (% v/p)	Concentración de agua (% v/p)
1	4.17	17.77
2	3.68	19.63
3	3.91	19.01
4	3.76	18.08
5	4.12	17.55
6	5.21	17.50
7	4.01	17.87
Promedio	4.12 ± 0.51	18.20 ± 0.81

3.3.2.8 Inyección de disoluciones de vainillina en el sistema FIA

Para comprobar que no existía interferencia de la vainillina (principal componente de la vainilla) en la reacción de Karl Fischer por la presencia del grupo carbonilo se prepararon disoluciones de vainillina en metanol en concentraciones del 0.5 % al 5 % (p/v) y se inyectaron al sistema FIA para la determinación de agua.

Cuando se inyectaron estas disoluciones al sistema FIA sólo se obtuvieron las señales del blanco. De tal forma que la vainillina aún en concentraciones del 5 % (p/v), no reacciona con el metanol para formar una molécula de agua, siendo que las mayores extracciones reportadas de vainillina son de 25.92 mg/g de vaina de vainilla ⁽²⁰⁾. Por lo tanto no existen interferencias atribuibles a este compuesto en las extracciones realizadas.

3.3.2.9 Espectros de los extractos de las muestras en metanol

Con los extractos que se obtuvieron de cada una de las especias en metanol, se obtuvo su espectro de absorción de 200 nm a 800 nm, para verificar que no existirán interferencias a 600 nm, longitud de onda a la que se midió la reacción del agua con el reactivo de Karl Fischer. La lectura se hizo en un espectrofotómetro Cary 3 UV-VIS y se utilizó una celda de cuarzo. En la figura 3.9 se ilustra un ejemplo de estos espectros.

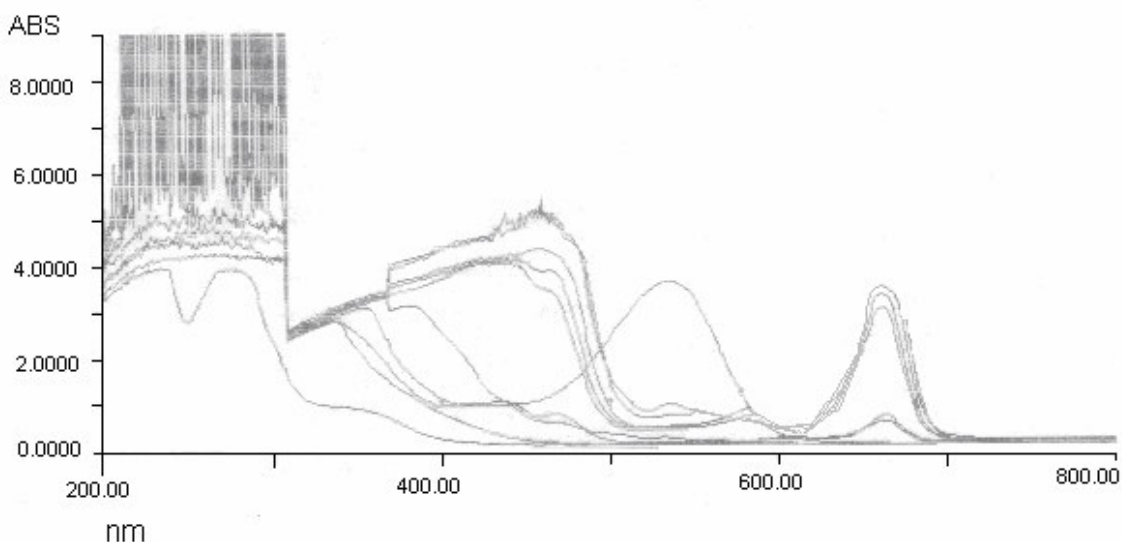


Figura 3.9 Espectros de absorción de diversos extractos de especias en metanol

Las interferencias de la muestra se pueden considerar despreciables, dada la pequeña cantidad de muestra que se inyecta al sistema y a que los tiempos de extracción que se utilizaron en este trabajo son muy cortos, comparados con el tiempo necesario para realizar la extracción de los componentes de las muestras vegetales. En el caso de las vainas de vainilla se han reportado 80 minutos utilizando la extracción asistida con ultrasonido para obtener el mayor rendimiento de vainillina ⁽²⁰⁾.

En el espectro de absorción de los extractos en la figura 3.9, no se ve ninguna absorción a una longitud de onda de 600 nm, por tanto no existen compuestos presentes en los extractos que absorban de forma significativa a la longitud de onda a la que se trabaja en el sistema FIA.

3.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS

3.4.1 Cuantificación de agua

Para conocer la cantidad de agua presente en cada muestra, su extracto se inyectó tres veces en el sistema FIA y se sacó un promedio de las tres señales. Además se realizó la lectura del blanco (metanol), la cual se restó a cada una de las señales. Diariamente se corrió la curva de calibración para evitar interferencias por los cambios de la humedad presente en el medio ambiente.

Con la absorbancia final se cuantificó la cantidad de agua en cada disolución, utilizando la ecuación de la recta con la que se ajustó la curva de calibración. Para el caso de los extractos de muestras, fue necesario relacionar el [% H₂O v/v] con la cantidad de muestra y el volumen de metanol empleados, para conocer la concentración de agua en la muestra en % v/p.

3.4.2 Muestras de especias y granos de café

Para el análisis de las muestras, además de los métodos de extracción con metanol, se realizó la medición de humedad de acuerdo al método ASTM D1348-94 ⁽⁴³⁾ para especias y a la norma NMX-F-552-1998-SCFI ⁽²⁴⁾ para granos de café.

En total se analizaron once especias deshidratadas, cinco muestras de café en grano y tres muestras de especias no deshidratadas.

En la Tabla 3.6 se muestra el promedio de la cantidad de agua cuantificada en las tres extracciones realizadas con cada método de extracción para cada muestra, además de la humedad presente en las mismas muestras también, hecha por triplicado.

Tabla 3.6 Contenido de agua y humedad en las muestras analizadas

Muestra	Secado (% humedad)	Agitación (% H₂O v/p)	Maceración (% H₂O v/p)	EAU (% H₂O v/p)
Cilantro	7.82 ± 0.13	3.85 ± 0.23	3.67 ± 0.24	4.81 ± 0.06
Damiana	8.17 ± 0.04	6.21 ± 0.29	5.09 ± 0.53	4.48 ± 0.11
Epazote	7.71 ± 0.25	4.39 ± 0.29	4.50 ± 0.25	3.39 ± 0.46
Flor de jamaica	17.49 ± 2.22	8.27 ± 1.16	10.79 ± 1.04	10.11 ± 0.14
Hierbabuena	14.02 ± 0.77	3.11 ± 0.64	3.86 ± 0.27	3.77 ± 0.66
Hoja de aguacate	5.02 ± 0.11	0.71 ± 0.38	1.91 ± 0.43	1.71 ± 0.12
Orégano	6.13 ± 0.05	5.82 ± 0.57	6.60 ± 0.29	6.09 ± 0.21
Perejil	5.56 ± 0.01	6.44 ± 1.29	5.54 ± 0.43	4.14 ± 0.04
Pimienta gorda	8.00 ± 0.05	1.84 ± 1.61	2.96 ± 0.85	3.85 ± 0.36
Pingüica	6.78 ± 0.08	3.38 ± 0.45	4.46 ± 0.42	4.59 ± 0.19
Vainilla	29.95 ± 0.33	14.78 ± 0.56	16.23 ± 0.80	18.80 ± 0.17
Cilantro fresco	86.54 ± 0.06	82.08 ± 2.21	81.42 ± 1.01	77.74 ± 3.44
Hierbabuena fresca	81.24 ± 0.19	71.83 ± 3.85	74.77 ± 1.52	55.14 ± 4.66
Perejil fresco	82.28 ± 1.00	67.26 ± 13.08	80.31 ± 6.27	82.38 ± 1.76
Planchuela 1^a	2.26 ± 0.81	1.72 ± 0.56	1.49 ± 0.62	2.79 ± 0.38
Planchuela 2^b	10.44 ± 0.05	2.96 ± 0.50	4.85 ± 0.09	3.76 ± 0.26
Planchuela 3^b	8.19 ± 0.17	3.17 ± 0.09	2.56 ± 0.23	4.02 ± 0.47
Planchuela 4^a	2.37 ± 0.03	1.36 ± 0.14	1.58 ± 0.36	0.99 ± 0.23
Caracolillo 1^a	2.15 ± 0.01	1.68 ± 0.45	1.82 ± 0.17	1.20 ± 0.43
Caracolillo 2^b	8.93 ± 0.04	4.52 ± 0.63	4.65 ± 0.44	3.88 ± 0.43

Donde: Planchuela 1: planchuela descafeinado tostado. Planchuela 2: planchuela descafeinado verde. Planchuela 3: planchuela verde. Planchuela 4: planchuela tostado. Caracolillo1: caracolillo tostado. Caracolillo 2: caracolillo verde.

^a tostado, ^b verde

Los resultados obtenidos con los métodos de extracción con disolventes (maceración, agitación y ultrasonido) mostraron resultados similares entre ellos, si

bien las desviaciones estándar de los resultados obtenidos utilizando la extracción asistida con ultrasonido fueron menores que para los otros dos métodos de extracción en la mayoría de los casos.

Las humedad obtenida con el método de secado para las diferentes muestras analizadas fue mucho mayor a la cantidad de agua extraída por los otros tres métodos, en algunos casos casi del doble, por ejemplo en las muestras de vainilla, cilantro, epazote y jamaica y del triple o más para la hierbabuena; aunque en otros casos las diferencias con el método de secado fueron tan sólo del 1 % o 2 % como en el perejil y la pingüica. Estas diferencias se atribuyen a que en el caso de las especias con mayor cantidad de material volátil, las diferencias son mayores.

Sin embargo, las mediciones de cantidad de agua y humedad en las muestras de orégano, fueron muy similares entre sí. Para explicarlo se debe considerar que las muestras analizadas de esta especia se encontraban molidas, prácticamente hechas polvo; por lo cual es de suponer que hayan perdido la mayor parte de su material volátil antes de los análisis.

En el caso particular de la vainas de vainilla se han hecho estudios en los cuales se ha medido la cantidad de vainillina (principal constituyente de la vainilla) antes y después de secar la vaina de vainilla beneficiada. En ellos se ha encontrado que antes de secar la vaina de la vainilla beneficiada tiene 23.06 ± 0.46 mg/g de vainillina y después de llevar a cabo el secado en estufa la cantidad de vainillina disminuye a 18.65 ± 0.45 mg/g⁽²⁰⁾. Generalizando los resultados de este estudio a las otras especias, podemos considerar que en todas las especias pasa algo similar y entonces es posible atribuir la diferencia entre el método de secado y la extracción con metanol y cuantificación con el sistema FIA utilizando el reactivo de Karl Fischer, a la pérdida de material volátil en el secado.

Como se trabajó con especias, que se caracterizan por su poder saborizante y aromático, aumenta la probabilidad de la pérdida de material volátil junto con el agua presente en la muestra. Por tanto, a mayor cantidad de material volátil en la muestra la diferencia entre los métodos de extracción con disolventes con el

método de secado es mayor. Además, los resultados de humedad obtenidos por el método de secado presentaron las menores desviaciones estándar de todos los métodos probados, debido a que el secado de las muestras se hizo hasta llegar a peso constante. Sin embargo, como se ve en la Tabla 3.7 para llegar a peso constante se requirieron de 10 a 40 horas de secado, dependiendo de la humedad de la muestra, lo cual constituye una enorme desventaja frente a los métodos de extracción con disolventes.

Tabla 3.7 Método de secado hasta peso constante para las muestras de especias

Especia	Secado (% de humedad)	Tiempo total de análisis (horas)
Cilantro	7.82 ± 0.13	30
Damiana	8.17 ± 0.04	10
Epazote	7.71 ± 0.25	25
Flor de jamaica	17.49 ± 2.22	25
Hierbabuena	14.02 ± 0.77	25
Hoja de aguacate	5.02 ± 0.11	20
Hoja Santa	6.13 ± 0.05	25
Laurel	5.56 ± 0.01	30
Orégano	8.00 ± 0.05	10
Perejil	6.78 ± 0.08	20
Pimienta gorda	29.95 ± 0.33	25
Pingüica	86.54 ± 0.06	30
Vainilla	81.24 ± 0.19	40
Cilantro fresco	86.54 ± 0.06	15
Hierbabuena fresca	81.24 ± 0.19	10
Perejil fresco	82.28 ± 1.00	15

En el caso de las muestras de grano de café, también existió diferencia entre los resultados de los métodos con extracción con metanol respecto al método de secado. El contenido de humedad en el café verde en grano fue del 8 % al 10 %, mientras que el contenido de agua fue de alrededor del 4 % (v/p); para las muestras de café tostado la humedad fue del 2 % y la cantidad de agua de entre el 1 % al 3 % (v/p). Para las muestras de café tostado el contenido de humedad es muy similar al contenido de agua; sin embargo, para las muestras de café verde el contenido de humedad es casi dos veces la cantidad de agua que se determinó.

Estas diferencias se pueden atribuir a que el café tostado se somete a un tratamiento de temperatura antes de su venta, a diferencia del café verde, y que al realizar el método de secado en el laboratorio, a la pérdida de masa debida a la humedad de la muestra, se debe sumar la debida a la degradación de los componentes de la muestra.

En cuanto a las tres muestras analizadas de especias frescas (cilantro, hierbabuena y perejil), los resultados obtenidos tanto por EAU, maceración y agitación magnética presentan las mayores desviaciones estándar del total de especias analizadas, lo cual se debe a que únicamente se trabajó con 0.15 g de muestra debido al alto contenido de agua que era de suponerse tenía cada muestra, por lo cual es difícil garantizar la homogeneidad de las muestras analizadas.

3.4.3 Recobros en extractos de especias y granos de café después de la EAU

Para asegurar que no existían interferencias por efectos matriz al llevar a cabo la EAU en la diferentes muestras de especias, se agregó una cantidad conocida de agua al extracto de la muestra y se calculó el recobro.

Después de realizar la extracción, se tomaron 5 mL del extracto de la muestra y con este volumen se efectuaron tres inyecciones al sistema FIA. A continuación se agregaron 5 mL de una disolución al 1% (v/v) de agua en metanol a la cámara de extracción; previamente se analizó el contenido de agua en esta disolución con el sistema FIA, se mezcló todo y se inyectó al sistema FIA. Para aspirar los 5 mL del extracto y agregar los 5 mL de la disolución al 1% (v/v) de agua a la cámara de extracción, se utilizó una bomba peristáltica.

Por medio de la Ecuación 10 se obtuvo la cantidad de agua teórica, que se debería conseguir al fortificar la muestra.

$$Cantidad\ de\ agua\ teórica = \left[\left(\frac{\% H_2O (v/v)\ del\ estándar}{100} \right) (5mL) \right] + [H_2O (v/p)\ de\ la\ muestra]$$

(10)

Con la absorbancia obtenida por el extracto de la muestra fortificada, se hicieron los cálculos para obtener la concentración de agua en v/p, al dato final se le llamó cantidad de agua real. Para conocer el recobro de la cantidad de agua agregada a la muestra se utilizó la Ecuación 11.

$$\% Recobro = \left(\frac{Cantidad\ de\ agua\ real}{Cantidad\ de\ agua\ teórico} \right) (100)$$

(11)

En la Tabla 3.8 se muestran los datos obtenidos para las muestras deshidratadas.

Tabla 3.8 Recobros en muestras de especias secas y granos de café

Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)
Cilantro	88.8	Pimienta gorda	97.4
Damiana	104.9	Pingüica	90.4
Epazote	85.0	Vainilla	98.1
Flor de jamaica	90.3	Planchuela 1^a	96.3
Hierbabuena	95.6	Planchuela 2^b	103.1
Hoja de aguacate	95.6	Planchuela 3^b	94.8
Hoja Santa	105.8	Planchuela 4^a	100.3
Laurel	99.9	Caracolillo 1^a	103.6
Orégano	98.6	Caracolillo 2^b	98.7
Perejil	94.6		

Donde: Planchuela 1: planchuela descafeinado tostado. Planchuela 2: planchuela descafeinado verde. Planchuela 3: planchuela verde. Planchuela 4: planchuela tostado. Caracolillo1: caracolillo tostado. Caracolillo 2: caracolillo verde.

^a tostado, ^b verde

Los recobros para todas las muestras de especias estuvieron en un intervalo entre el 85 %, para el epazote y el 105 % para la hoja santa, mientras que, en la muestras de los diferentes tipos de café en grano fueron del 96 % al 103 %. Por lo tanto, podemos decir que no hay interferencias de matriz apreciables en la determinación de agua en las muestras analizadas.

3.4.4 Comparación por regresión de la extracción con disolventes convencional con la EAU.

Los datos de la Tabla 3.7 para especias seca y granos de café, se utilizaron para comparar la extracción asistida con ultrasonido con la extracción por maceración y por agitación magnética, utilizando rectas de regresión. En la Tabla 3.9 se reportan los resultados obtenidos en dicha comparación.

Tabla 3.9 Correlación entre los valores obtenidos con la extracción asistida con ultrasonido y los de maceración y agitación magnética

	Ultrasonido vs maceración	Ultrasonido vs agitación magnética
Coefficiente de correlación (r)	0.9581	0.9509
Pendiente (m)	1.050	1.158
Ordenada al origen (b)	-0.388	-0.152

De acuerdo a los resultados podemos decir que la EAU puede sustituir a las extracciones convencionales reportadas, representando un ahorro de tiempo. Si además se acopla al sistema FIA para la cuantificación de agua a la extracción en línea, la velocidad y facilidad del análisis aumentan.

3.4.5 Ventajas de la EAU acoplada a un sistema FIA

En la figura 3.10 se muestra un diagrama de la determinación de agua en extractos de vainilla, donde se puede constatar que en 12 minutos se pueden analizar tres extractos de vainas de vainilla beneficiada.

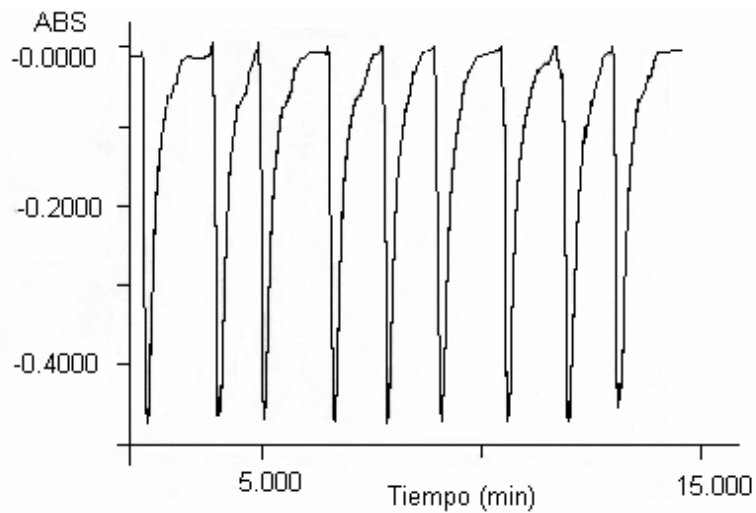


Figura 3.10 Inyección al sistema FIA de tres extractos de vainilla en metanol

Si bien los resultados que se obtienen con los tres métodos de extracción con disolventes son similares, la extracción asistida con ultrasonido para muestras con un contenido de agua menor al 12 % (v/p) requiere sólo de 1 minuto 20 s y para muestras con más del 12 % (v/p) se necesitan 9 minutos, lo cual representa un ahorro del 85 % y 70 % de tiempo respecto a una extracción por maceración y por agitación magnética, respectivamente, en muestras con un contenido mayor al 12 % (v/p) de agua; mientras que para muestras con menos del 12 % (v/p) de agua el ahorro de tiempo es del 98 % y 95.5 % de tiempo respecto a una extracción por maceración y por agitación magnética, respectivamente.

En la Tabla 3.10 se hace un resumen de los tiempos de extracción requeridos para cada método de extracción con disolventes y el tiempo total de análisis por triplicado con cada método

Tabla 3.10 Tiempos de extracción y análisis utilizado los métodos de extracción con disolventes

Método de extracción		Tiempo de extracción	Tiempo de extracción por triplicado	Tiempo de cuantificación de tres muestras	Tiempo total de análisis por triplicado
Maceración		60 min	180 min	12 min	192 min
Agitación Magnética		30 min	90 min	12 min	102 min
EAU	Contenido de agua menor al 12% (v/p)	1 min 20 s	4 min	12 min	16 min
	Contenido de agua mayor al 12% (v/p)	9 min	27 min	12 min	39 min

Si se realiza la comparación de los tiempos de análisis de los métodos de extracción con agitación magnética y maceración acoplados al sistema FIA con la EAU acoplada al sistema FIA, los tiempos de análisis para las muestras con un contenido de agua superior al 12 % por maceración y agitación magnética es 4.9 y 2.6 veces superior al tiempo de análisis con la EAU, mientras que para muestras con un contenido de agua menor al 12 % los tiempos de análisis por maceración y agitación magnética son 12 y 6.3 veces superiores que los necesarios para realizar la EAU.

Además de la ventaja que representa el gran ahorro de tiempo en la extracción asistida con ultrasonido, hay que agregar que la desviación estándar entre muestras es menor con respecto a los otros dos métodos de extracción con disolventes, de acuerdo a la Tabla 3.6.

3.5 EXACTITUD DEL MÉTODO DE SECADO

Se utilizó un estándar Hydranal® de tartrato de sodio dihidratado número de referencia 34696 (15.64 ± 0.002 % de agua, $n = 3$), trazable a NIST SRM 2890, el cual se secó a 150 ± 3 °C por 4 horas, tal como indica la documentación del

estándar certificado. En el análisis realizado se encontró $15.643 \pm 0.010\%$ de agua ($n = 3$), por lo tanto este método tiene una exactitud del 100.02 %.

3.6 COMPARACIÓN ENTRE LA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES Y EL MÉTODO DE SECADO

Cuando se comparan los datos obtenidos con las extracciones con disolventes contra los obtenidos por el método de secado hasta peso constante se encuentran notables diferencias, las cuales se atribuyeron a la pérdida de material volátil.

Para evaluar la exactitud de los métodos de secado se utilizó un material de referencia, el estándar Hydranal® de tartrato de sodio dihidratado trazable a NIST SRM 2890. Dicho estándar se iba a utilizar para comparar la determinación de agua con el sistema FIA propuesto y con el método de secado, pero como no es del todo soluble en metanol no fue posible utilizarlo para FIA.

Para poder comprobar que con el sistema FIA para la determinación de agua utilizando el reactivo de Karl Fischer y el método de secado en estufa se obtendrían los mismos resultados si no hubiera compuestos volátiles, se ideó utilizar una matriz en la que no existiera material volátil que interfiera en la determinación de agua. Tal matriz la constituyeron las tierras diatomáceas, debido a que el tartrato de sodio dihidratado no es completamente soluble en metanol.

3.6.1 Tierras diatomáceas fortificadas

Se secaron tierras diatomáceas Celite® a 150 ± 3 °C por períodos de 4 horas, hasta que la pérdida de masa entre dos pesadas sucesivas no fue mayor a 0.005 g. De las tierras diatomáceas que se secaron, se tomaron seis muestras de 2.5 g y se les agregó 0.1 g de agua destilada, para obtener una concentración aproximada de 0.4 % (v/p) de agua.

La determinación del contenido de agua de las tierras diatomáceas fortificadas, se hizo por medio de dos procedimientos, cada uno por triplicado. El primer método fue el de secado a una temperatura de 150 ± 3 °C por 4 horas y el segundo el de extracción con disolventes por agitación magnética; en el último método la

cantidad de agua se midió utilizando el sistema FIA. Los resultados de ambos experimentos se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11 Comparación entre el sistema FIA para la determinación de agua y el método de secado en tierras diatomáceas fortificadas

Réplica	Método de secado	Sistema FIA
1	3.78	3.83
2	3.88	3.84
3	3.86	3.71
Media	3.84 ± 0.54	3.79 ± 0.74

3.6.1.1 Estudio de significancia entre la extracción asistida con disolventes y el método de secado en estufa

Con los resultados de la Tabla 3.11 se llevó a cabo un estudio de contraste F para la comparación de las varianzas entre el método de secado en estufa y los resultados del sistema FIA, tomando como hipótesis nula que las varianzas entre los dos métodos son iguales. El estadístico F se calculó de acuerdo a la Ecuación 12, donde s_1 y s_2 son los cuadrados de las desviaciones estándar de cada método.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (12)$$

El valor de F que se obtiene es de 1.89 y el valor crítico de F es de 799.5 ($p = 0.05$ en un contraste de dos colas). Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre las dos varianzas y se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto, la comparación entre medias se hizo utilizando las Ecuaciones 13 y 14 y se propone la hipótesis nula de que las medias de los resultados de los dos métodos en estudio son iguales.

$$|t| = \frac{x_1 - x_2}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1}\right) + \left(\frac{1}{n_2}\right)}} \quad (13)$$

donde s se calcula a partir de la ecuación:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (14)$$

y $|t|$ tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad y x_1 y x_2 son las medias de los métodos evaluados.

Existen 4 grados de libertad, así que el valor crítico de $|t|$ es de 3.78 ($p = 0.05$). Como el valor experimental de $|t|$ es de 0.38 la diferencia entre los dos métodos no resulta significativa a un nivel de significancia del 5 % y es posible concluir que los resultados entre los dos métodos son iguales aceptando la hipótesis nula, cuando no existe material volátil que pueda interferir en la determinación de agua por el método de secado.

3.7 Comparación entre métodos

Tomando en cuenta que no existe diferencia significativa entre el método de secado en estufa con el resultado del sistema FIA cuando no hay material volátil para la cuantificación de agua y que ya hemos comprobado que los resultados obtenidos con los tres métodos de extracción con disolventes son similares, entonces la EAU presenta la enorme ventaja de la rapidez de la determinación de agua en muestras de especias y granos de café, respecto a las extracciones tradicionales con disolventes, además, de que el tiempo de análisis es muchísimo menor que en el análisis por pérdida de peso.

La EAU acoplada al sistema FIA para la determinación de agua representa un ahorro mayor al 70% de tiempo respecto a la maceración y a la extracción por agitación magnética, de esta forma la extracción en línea asistida con ultrasonido acoplada al sistema FIA para la determinación de agua, constituye una excelente alternativa para la extracción y determinación de agua en muestras de especias y de café en grano. Con esto se reducen el tiempo de análisis de la muestra, los errores por contaminación de agua del medio ambiente, los errores humanos debido a la automatización del sistema y por tanto la facilidad de trabajar durante

períodos de tiempo prolongados sin la necesidad de la supervisión humana, igualmente, se reduce considerablemente el gasto de disolventes y reactivos, por lo tanto también disminuye el costo por análisis y la cantidad de desechos que se generan.

4 CONCLUSIONES

El sistema FIA utilizado para la determinación de agua utilizando el RKF demostró ser preciso, exacto y rápido (menos de 1.5 minutos por inyección); lo que lo convierte en una buena opción para la cuantificación de agua en extractos de especias.

Se comprobó que la diferencia existente entre el método de secado y los métodos de extracción con metanol, se debe a que el primero cuantifica no sólo la pérdida de agua de la muestra si no también la pérdida de compuestos volátiles, a diferencia de la extracción con metanol.

Los resultados que se obtienen con los tres métodos de extracción con metanol son similares, por lo cual el método propuesto de la EAU se puede utilizar para sustituir los métodos convencionales de extracción de agua por maceración o agitación.

La EAU en muestras con un contenido de agua mayor al 12 % (v/p) requiere de 9 minutos. Lo cual representa un ahorro del 85 % y 70 % de tiempo respecto a una extracción por maceración y por agitación magnética, respectivamente.

Para muestras con menos del 12 % (v/p) de agua, el tiempo de extracción es sólo de 2 minutos, por lo tanto, el ahorro de tiempo es del 98 % y 95.5 % respecto a una extracción por maceración y por agitación magnética, respectivamente.

El tiempo total de extracción y cuantificación para una muestra con más del 12 % (v/p) de agua es de 15 minutos y para muestras con menos del 12 % (v/p) es de 7.5 minutos.

Por lo tanto, el sistema FIA para la determinación de agua acoplado a la EAU en línea, resulta una excelente opción para este tipo de determinaciones en muestras de especias deshidratadas y granos de café.

5 EXPECTATIVAS

Con el fin de incorporar mejoras y ampliar el número de muestras analizadas en el trabajo realizado, se sugieren los siguientes puntos:

- Sería conveniente ampliar la determinación del contenido de agua a otras especias y al análisis de frutas secas mediante el sistema propuesto de análisis por inyección en flujo y la extracción asistida con ultrasonido en línea. Algunas de estas especias podrían ser: hoja santa, cominos y laurel.
- Igualmente sería interesante cuantificar el contenido de agua y vainillina en vainas de vainilla beneficiada, conforme va avanzando el proceso de curado de esta vaina, para relacionar el contenido de agua con el contenido de vainillina presente.
- Otro punto importante sería realizar una optimización para especias que tuvieran un contenido de agua de entre 12 % y 18 %, en caso de encontrarse.

Finalmente, se podría realizar el análisis de los componentes que pierde cada una de las muestras analizadas cuando se someten al proceso de secado con temperatura.

6 REFERENCIAS

1. Meyers R. A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation*. Ed. John Wiley. Amsterdam, 2000; Vol. 5, pp. 4203-4206, 4318-4332, 13483-13495.
2. Yazgan S., Bernreuther A., Ulberth F., Isengrand H-D. Water – an important parameter for the preparation and proper use of certified reference materials. *Food Chemistry*. **2006**, *96*, pp. 411-417.
3. Yeshajaju P., Clifta E. M. *Food Analysis Theory and Practice*, 3° Edición; Ed. Chapman and Hall. New York, 1994. Cap. 34, pp. 575-599.
4. Nielsen S. S. *Food Analysis*. 3° Edición; Ed. Kluwer Academic. New York, 2003. Cap. 6, pp. 81-101.
5. Kirk. R.S., Sawyer R. *Pearson's Composition and Analysis of Foods*. 9° Edición, Ed. Longman Scientific & Technical. Singapore, 1991. Cap. 11, pp. 391-415.
6. Rish S. J. y Tang Ho C. *Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*. ACS Symposium Series 660. Ed. American Chemical Society. Washington, 1997. Cap.1, pp. 2-6, 30-40.
7. Alcaraz M. L., "Estudio de las condiciones para la micropropagación de damiana (*Turnera Difusa*). Tesis, Doctoral en Ciencias (Biología), Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1999.
8. Base de datos de plantas trópicas: <http://www.rain-tree.com/plants.htm>
9. Hortalizas de estación fría. Universidad Católica de Chile. <http://www.puc.cl/sw/educ/hort0498/HTML/p096.html>

10. García. M. L., “Extracción del aceite esencial y la oleorresina de cilantro (*coriandrum satium*)”. Tesis, Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1984.
11. Medicina tradicional y herbolaria Tlahui:
<http://www.tlahui.com/medic/medic14/hchenopo.htm>
12. Vega R. G., “Extracción y caracterización de los aceites esenciales de hierbabuena (*mentha piperita*) y hoja santa (*piper auritum*) y su uso en formulaciones en alimentos”. Tesis, Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1986.
13. Suárez P. G., “Validación del efecto antiinflamatorio de flavonoides presentes en la hoja de aguacate (*Persea America Mill*) utilizada en el poblado de Santo Domingo Xagacia”. Tesis, Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2000.
14. Tsaia P-J.; McIntoshb J.; Pearceb P.; Camdenb B.; Jordanc R., “Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*) extract”. *Food Research International*. **2002**, 35, pp. 351–356.
15. Pazos D. J. G., “Extracción y caracterización de oleorresina y aceite esencial de pimienta gorda (*Pimienta Officialis L.*)”. Tesis, Químico en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1998.
16. Macía B. M. J. “La pimienta de Jamaica (*Pimienta Dioica L., Merrill, Myrtaceae*) en la sierra norte de Puebla”. *Anales Jardín Botánico de Madrid*. **1998**, 56, 2, pp. 337-349.
17. Ampofo S. A.; Roussis V.; Wiemer D. F. “New prenylated phenolics from piper auritum”, *Phytochemistry*. **1989**, 2, pp. 654-655.
18. Página de la Semarnat: <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/indices.html>

19. García A. G. "Obtención de carvacrol por destilación fraccionada a partir de aceite esencial de orégano". Tesis, Ingeniero Químico. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2001.
20. Longares P. A.; Cañizares M. M. P. "Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanilla and *p*-hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans", *Talanta*. **2006**, 69, pp. 882-887.
21. Bruneton J. *Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales*. 2º Edición, Ed. Acribia. 2001, Zaragoza, Parte 3, pp. 477-566.
22. Bravo D. L. *Farmacognosia*. Serie farmacia actual. Ed. Elsevier. 2003, Sevilla, pp. 171-173.
23. Astiasarán I., Martínez J. A. *Alimentos: Composición y Propiedades*. 2º Edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. 2000, Madrid. Cap. 8, pp.169-193.
24. Norma Mexicana, NMX-F-552-1998-SCFI, Café verde descafeinado – Especificaciones y Métodos de Prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial: México, 1998.
25. Norma Mexicana, NMX-149-SCFI-2001, Café Veracruzano. Especificaciones y Métodos de Prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial: México, 2001.
26. Belit H-D.; Grosch W. *Food Chemistry*, 2º Edición; Ed. Springer, Berlin. 1999, Cap. 21, pp. 874-923.
27. Reh C. T.; Gerber A.; Prodolliet J.; Vuataz G. "Water content determination in green coffee – Method comparison to study specificity and accuracy", *Food Chemistry*. **2006**, 96, pp. 423-430
28. Página Central del Café: <http://www.centraldecafe.com.ar/cafe.asp>

29. Jalbert J.; Gilbert R.; Tétreault P. "Determination of the analytical performance of a headspace capillary gas chromatographic technique and Karl Fischer coulometric titration by system calibration using oil samples containing known amounts of moisture". *Analytical Chemistry*, **1999**, *71*, pp. 3283-3291.
30. Pfaue H- B. "Analysis of water in food by near infrared spectroscopy". *Food Chemistry*. **2003**, *82*, pp. 107-115.
31. Giangiaccomo R. "Study of water-sugar interactions at increasing sugar concentration by NIR spectroscopy". *Food Chemistry*. **2006**, *96*, pp. 371-379
32. Gleiter R. A.; Horn H.; Isengard H. D. "Influence of type and state of crystallization on the water activity of honey". *Food Chemistry*. **2006**, *96*, pp. 441-445.
33. Norma Mexicana, NMX-FF-074-1996, Productos Alimenticios no industrializados para consumo humano – especias y condimentos – entera y en estado seco –vainilla (*Vanilla fragans*, Salisbury, Ames o *Vanilla planifolia* Andrews) – Especificaciones. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial: México, 1996.
34. Supartono W.; Rückold S.; Isengard H-D. "Karl Fischer titration as an alternative method for determining the water content of cloves". *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*. **1998**, *31*, 4, pp. 402-405.
35. Schimid M. J. "Determinación del contenido de agua según el método de Karl Fisher I". *Noticias Técnicas de Laboratorio*. **2003**, *4*, p.4.
36. McLeod S. K. "Moisture determination using Karl Fischer titrations". *Analytical Chemistry*. **1991**, *63*, 10, pp. 557A-566A.
37. Schimid M. J. "Determinación del contenido de agua según el método de Karl Fisher II". *Noticias Técnicas de Laboratorio*. **2004**, *1*, pp.18-20.

38. Bryan W. P.; Rao B. "Comparison of Standard in the Karl Fisher Method for water determination". *Analytica Chimica Acta*. **1976**, *84*, pp. 149-155.
39. Kagevall I.; Astrom O.; Cedergren A. "Determination of water by flow injection analysis with the Karl Fischer reagent". *Analytica Chimica Acta*. **1980**, *114*, pp. 199-208.
40. Koupparls M.; Malmstadt H. "Determination of water by an automated stopped-flow analyzer with pyridine-free two-component Karl Fischer reagent". *Analytical Chemistry*. **1982**, *54*, pp. 1914-1917.
41. Dantan. N.; Kröning S.; Frenzel W.; Küppers S. "Comparison of spectrophotometric detection for the determination of water using Karl Fischer method under flow injection analysis conditions". *Analytica Chimica Acta*. **2000**. *420*, pp. 133-142.
42. Schimid M. J. "Determinación del contenido de agua según el método de Karl Fisher III". *Noticias Técnicas de Laboratorio*. **2004**, *2*, pp.12-14.
43. American Society for Testing and Material. Annual book of ASTM. ASTM D 1348-94; Philadelphia, Pennsylvania. **2003**; Vol. 6.03. pp. 287-292.
44. Schimid M. J. "Determinación del contenido de agua según el método de Karl Fisher IV". *Noticias Técnicas de Laboratorio*. **2004**, *3*, p.26.
45. Larsson W.; Jalbert J.; Gilbert R.; Cedergren A. "Efficiency of methods for Karl Fischer determination of water in oils based on oven evaporation and azeotropic distillation". *Analytical Chemistry*. **2003**, *75*, *6*, pp.1227-1232.
46. Kagevall I.; Avström O. "Minimization of interference effects from iodine-consuming samples in the determination of water with the Karl Fischer reagent in a flow-injection system". *Analytica Chimica Acta*. **1981**, *132*, pp. 215-218.

47. Koupparis M. A.; Malmstadt H. V. "Determination of water by automated stopped-flow analyzer with pyridine-free two-component Karl Fischer reagent". *Analytical Chemistry*, **1982**, *54*, pp. 1914-117.
48. Stewart K. K.; Beecher G. R.; Hare P. E. "Rapid analysis of discrete samples: The use of nonsegmented, continuous flow". *Analytical Biochemistry*, **1976**, *70*, pp. 167.
49. Ruzicka J.; Hansen E. H. "Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis "Analytica Chimica Acta, **1975**, *78*, pp. 145-157.
50. Skoog D. A.; Holler J. F.; Nieman T. A. "*Principios de análisis Instrumental*". 5° Edición, Ed. McGrawHill, España, 2001. Cap. 38, pp. 897-918.
51. Valcarcel M.; Luque de Castro M. D. "*Análisis por Inyección en flujo*". Ed. Universidad de Córdoba, Córdoba, España, 1984. Capítulos 2-5, pp. 45-139.
52. Raynie D. E. "Modern extraction techniques". *Analytical Chemistry*, **2006**, *78*, pp. 3997-4004.
53. Schinor E. C.; Salvador M. J.; Turatti I. C. C.; Zucchi O. L.; Dias D. A. "Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp". *Ultrasonics Sonochemistry*, **2004**, *11*, pp. 415-421.
54. Vinatoru M. "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herb". *Ultrasonics Sonochemistry*, **2001**, *8*, pp. 303-313.
55. *McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology*. 7ª Edición, Ed. McGraw-Hill, USA, 1992, Vol. 19, pp. 9 -18.

56. Luque-García J. L.; Luque de Castro M. D. "Ultrasound: a powerful tool for leaching". *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 1, pp. 41-47.
57. Sonochemistry:
http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2004/bristol_eaimkhong/theory1.htm
58. Luque-García J. L.; Luque de Castro M. D. "Continuous ultrasound – assisted extraction of hexavalent chromium from soil with or without on-line preconcentration prior to photometric monitoring". *The Analyst*, **2002**, 127, pp. 1115-1120.
59. Mason T.J.; Paniwnyk L.; Lorimer J. P. "The uses of ultrasound in food technology". *Ultrasonics Sonochemistry*, **1996**, 3, pp. S253-S260.
60. Dantan. N.; Wolfgang F.; Kúppers S. "Determination of water traces in various organic solvents using Karl Fischer method FIA conditions" *Talanta*. **2000**. 52, pp. 101-109.
61. Miller J. C.; Miller J. N. *Estadística para Química Analítica*. 2° Edición, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. 1993, Delaware, 1993; Cap.5, pp. 100-103.
62. Massart D. L.; Mandeginste B. G.; Buydens L. M. C.; De Jong S.; Lewi P. S. ; Smeyers - Verbeke J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Ed. Elsevier, New York, Cap. 13, 1998, pp. 388-389.
63. Thiex N.; Eren V. T. "Comparisons of Karl Fischer method with oven methods for determination of water in forages and animal feeds". *Agricultural Materials*. **1999**. 82, 4, pp. 799-808.