



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

Facultad de Química
División de estudios de posgrado

Análisis de los compuestos volátiles
del café por cromatografía de gases-
bidimensional

Tesis que para obtener el grado de
maestra en Ciencias químicas (Química
Analítica), presenta:

FLOR MARIA SARMIENTO ZAMBRANO



1989

M-100831



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).

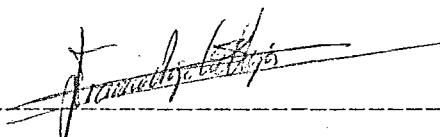
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

J U R A D O A S I G N A D O

Presidente	Dr. Armando Manjarrez Moreno
1 ^{er} Vocal	Dra. Luz Elena Vera Avila
Secretario	M. en C. Santiago Capella V.
Suplente	Dr. Octavio Reyes Salas
Suplente	M. en C. Francisco Rojo C.

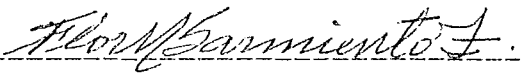
Sitio donde se desarrolló el tema:
Departamento de Química Analítica
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química, U.N.A.M.

Asesor de tesis:



M. en C. Francisco Rojo Callejas

Sustentante:



Flor María Sarmiento Zambrano

A

EFREN

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial a mi asesor M. en C. Francisco Rojo Callejas, por su constante apoyo y sabia dirección en la realización de este trabajo.

A la M. en C. Carmen Labastida Rubio, por sus pacientes orientaciones, las cuales me permitieron iniciarme en la práctica cromatográfica.

A los miembros del jurado por sus acertadas sugerencias y la revisión oportuna de esta tesis.

A la M. en Literatura Aura Cecilia Erazo Dorado, por la revisión del estilo gramatical.

A mis profesores, por sus valiosas enseñanzas.

Al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM., por haberme brindado todas las facilidades para llevar a cabo este trabajo.

C O N T E N I D O

	Pag.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1 INTRODUCCION	3
2 ANTECEDENTES	6
2.1 CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).....	6
2.1.1 Consideraciones generales	6
2.1.2 Instrumentación	10
2.1.3 Columnas capilares	15
2.2 PREPARACION DE LA MUESTRA	20
2.2.1 Destilación	21
2.2.2 Destilación por arrastre de vapor	21
2.2.3 Extracción	22
2.2.4 Métodos adsortivos	22
2.2.5 Técnica de purga y trampa	23
2.2.6 Pirólisis	24
2.2.7 Técnica de muestreo de vapor confinado "Head-space".....	25
2.2.7.1 Generalidades	25
2.2.7.2 Principios básicos	29
2.2.7.3 Instrumentación	32
2.2.7.4 Aplicaciones	35
2.3 CROMATOGRAFIA DE GASES BIDIMENSIONAL (CGBD)	39
2.3.1 Generalidades	39
2.3.2 Proceso de división de muestra "Heart cutting" ..	40
2.3.3 Instrumentación	45

2.3.4	Capacidad de resolución	47
2.4	ANALISIS DE LOS COMPUESTOS VOLATILES DEL CAFE ..	52
2.4.1	Composición química del café	52
2.4.2	Identificación de los compuestos	52
2.4.3	Formación del aroma	55
2.4.4	Investigaciones recientes	60
3	DESARROLLO EXPERIMENTAL	67
3.1	EQUIPO MATERIAL Y REACTIVOS	67
3.2	MONTAJE EXPERIMENTAL	69
3.3	CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO	77
3.3.1	Factores que influyen en el análisis "Head space"	77
3.3.2	Temperaturas de operación de las columnas	88
3.3.3	Condiciones rutinarias de trabajo	90
4	RESULTADOS Y DISCUSION	92
4.1	SEPARACION BIDIMENSIONAL	92
4.2	IDENTIFICACION DE COMPUESTOS SEPARADOS	102
4.3	COMPARACION DE TECNICAS	104
5	CONCLUSIONES Y COMENTARIOS	106
APENDICE I:		
	Comparación Cromatográfica de varios tipos de café.....	108
APENDICE II:		
	Algunos compuestos volátiles identificados en el café ...	114
	REFERENCIAS	117

RESUMEN

Un buen número de compuestos volátiles del café fue separado e identificado por cromatografía de gases bidimensional.

La muestra fue preparada por el método de análisis de vapor confinado "Head space", previa determinación experimental del efecto de diversas variables sobre la sensibilidad del análisis tales como: temperatura, tiempo de equilibrio, presión inicial, relación fase vapor/fase sólida, grado de molienda y grado de tostado.

Para desarrollar la cromatografía bidimensional, fue necesario hacer el montaje del sistema, acoplando dos cromatógrafos de gases. Se prepararon dos columnas capilares: SE-54 y Carbowax 20 M, las cuales se emplearon como precolumna y columna analítica, respectivamente.

Se demostró que por cromatografía de gases bidimensional se logra una mejor separación de los compuestos en estudio, que cuando se emplean las columnas individuales SE-54 y Carbowax 20M o la suma de ellas.

SUMMARY

A good number of volatile coffee compounds were separated and identified by bidimensional gas chromatography.

The sample was prepared by head-space analysis, after a previous experimental determination of the effect produced by different variables on the sensitivity of the analysis, such as temperature, equilibrium time, pressure, the relation of vapor phase to solid phase, grinding degree, and roasting degree.

In order to effectuate bidimensional chromatography, it was necessary to assemble the system by coupling two gas chromatographs. Two capillary columns were prepared: SE-54 and Carbowax 20M, which were employed as precolumn and analytical column, respectively.

It was shown that by means of bidimensional gas chromatography, a better separation of the compounds under study is achieved than that achieved by the columns SE-54 and Carbowax 20M taken separately or together.

1 INTRODUCCION

A pesar del impacto que han tenido las columnas capilares en cromatografía de gases, consideraciones prácticas y teóricas han demostrado que es imposible una resolución completa de los componentes de una mezcla compleja.

Los detectores específicos y la instrumentación computarizada cromatografía de gases/espectrometría de masas han ayudado en el análisis de la composición de mezclas complejas. Desafortunadamente estos métodos no son aplicables a todas las clases de compuestos.

Estas limitaciones cromatográficas pueden ser superadas por el uso de la cromatografía de gases bidimensional, la cual involucra la separación de los componentes de una muestra empleando dos columnas de diferente capacidad o selectividad.

La cromatografía de gases bidimensional se ha empleado muy poco, excepto en algunos laboratorios especializados en cromatografía de gases de alta resolución. Esto es más sorprendente si se considera que con un costo moderado pueden montarse sistemas relativamente sencillos.

Con este trabajo se pretende diseñar, montar y poner en funcionamiento un sistema bidimensional para cromatografía de gases que permita hacer frente a una variedad de problemas analíticos difíciles. Tal pretensión tiene como base el trabajo pionero de D.R. Deans, quien demostró con claridad la aplicación

práctica de esta técnica.

La muestra elegida para este análisis es el vapor de café, por constituir su aroma una mezcla compleja que contiene compuestos con un intervalo extenso de concentraciones, volatilidades y polaridades, los cuales deben separarse con mayor efectividad por cromatografía de gases bidimensional que por cualquier otra técnica. Además, el café se ha convertido en un producto muy importante del comercio internacional.

El análisis del aroma del café ha inquietado a los químicos durante muchos años. Sus esfuerzos han sido más fructíferos a raíz del desarrollo de la cromatografía de gases bidimensional. De acuerdo con la bibliografía consultada, la separación de los compuestos volátiles del café, llevada a cabo por esta técnica, se ha realizado valiéndose de una precolumna empacada y una columna analítica capilar y aplicando el sistema de purga y trampa como método de preparación de la muestra. En este trabajo se emplean dos columnas capilares y se prepara la muestra por el método de análisis del vapor confinado "Head space", que por su simplicidad, precisión y bajo costo, actualmente está sustituyendo a la técnica de purga y trampa en la mayoría de las aplicaciones.

En la primera parte de la tesis se hace una breve revisión de algunos tópicos de cromatografía de gases que se consideran básicos para el desarrollo de este trabajo. En el inciso sobre la preparación de la muestra se explica con algún detalle el análisis del vapor confinado "Head space" por constituir el método que se siguió para la preparación de la muestra de los compuestos volátiles del café.

A continuación se revisa el sistema bidimensional en cromatografía de gases, por ser este el objetivo principal de esta tesis.

Debido a que se seleccionó el café como la muestra a analizar se tratan algunos aspectos sobre éste, y se describen las investigaciones recientes sobre la separación de sus compuestos volátiles.

En la sección sobre el desarrollo experimental aparecen el montaje del equipo bidimensional y la determinación de las condiciones de trabajo.

Por último, se describen los resultados obtenidos con el trabajo realizado y se plantean las expectativas que se consideran importantes de tenerse en cuenta en futuros trabajos relacionados con el análisis del aroma por cromatografía de gases bidimensional.

2 ANTECEDENTES

2.1 CROMATOGRAFIA DE GASES

2.1.1 Consideraciones generales

"Cromatografía" es un término general para procesos de separación, en los cuales los componentes de una mezcla se equilibran repetitivamente entre dos fases; una de estas fases es fija o estacionaria y la otra es móvil. Cuando la fase móvil es un gas, puede utilizarse un líquido o un sólido como fase estacionaria, estos procesos son llamados "cromatografía de partición gas-líquido" y "cromatografía de partición gas-sólido" respectivamente. En la actualidad, se llaman simplemente "cromatografía de gases" (CG). Ocasionalmente se encuentran las expresiones CGL (cromatografía gas-líquido) o CFV (cromatografía en fase vapor), pero con pocas excepciones, estas son predominantes en la literatura antigua (1). En el proceso de cromatografía de gases, la fase líquida estacionaria es confinada en un tubo largo, la columna, en el cual, esta fase forma una película fina que se distribuye sobre un soporte granular inerte (columnas empacadas), o se soporta como una capa delgada sobre la superficie interna de la columna (columnas capilares). La columna, la cual comienza en el inyector del cromatógrafo de gases y termina en el detector, se ajusta a una temperatura conveniente y es barrida continuamente con la fase gaseosa móvil (gas acarreador).

Cuando se introduce una mezcla de compuestos volátiles en el inyector, cada constituyente es barrido hacia el detector, siempre que se encuentre dentro del gas acarreador. Los compuestos que son más solubles en la fase líquida estacionaria, se encuentran en el gas acarreador con menos frecuencia y requieren un período de tiempo más largo para llegar al detector que los componentes que son retenidos con menor fuerza por la fase líquida; en consecuencia se realiza la separación.

La información obtenida de un experimento cromatográfico está contenida en el cromatograma, un registro de la concentración o perfil de masas de los componentes de la muestra como una función de la acción de la fase móvil (2).

- La información obtenida del cromatograma, incluye una indicación de la complejidad de la muestra basada en el número de picos observados (3), identificación cualitativa de los componentes de la muestra basada en la determinación exacta de la posición del pico, evaluación cuantitativa de la concentración relativa o cantidad de cada pico y una indicación de la eficiencia de la columna (4), (5).

La figura 1, de la página 11, representa un cromatograma típico y puede usarse para ilustrar los resultados que se obtienen en un análisis por cromatografía de gases (6). Cuando solo sale de la columna el gas acarreador aparecerá dibujada una línea recta, la línea base. Cuando se eluyen los picos de la muestra con el perfil de su concentración, se obtienen dos parámetros importantes: el tiempo de retención (t_R) y el área del pico.

La cromatografía de gases (CG) presenta muchas ventajas, las principales son:

- Alta resolución.

La CG puede generar miles de platos teóricos en pocos minutos.

Las numerosas fases líquidas existentes permiten separaciones selectivas, así la CG provee una resolución que no es posible por destilación u otras técnicas.

- Sensibilidad.

Una de las razones principales por las que se usa ampliamente la CG en los análisis es la sensibilidad conseguida (7).

Debido a esta sensibilidad, la CG es un método preferido para el análisis de trazas. Otra ventaja de esta extrema sensibilidad es la pequeñez de la muestra requerida (microlitros).

- Velocidad.

La CG permite lograr rápidamente buenos resultados analíticos (8).

Muchas separaciones útiles se completan en 10 min. Sin embargo, análisis de alta resolución en mezclas complejas pueden llevar hasta dos horas.

- Análisis cualitativo.

El tiempo de retención es característico de la muestra y de la fase líquida a una temperatura dada. Con flujo conveniente y temperatura controlada, el t_R puede reproducirse alrededor de 1% (8) y puede ser usado para ayudar en la identificación de cada pico.

- Análisis cuantitativo.

El área del pico es proporcional a la concentración. Este concepto es útil para determinar la concentración de cada componente. La exactitud alcanzada con la CG depende del detector, método de integración y concentración de la muestra (8).

Se puede obtener buena exactitud en una amplia gama de concentraciones de la muestra, desde miligramos hasta nanogramos (6).

- Simplicidad.

Tanto las técnicas como el instrumental de la CG son relativamente sencillos y fáciles de operar y comprender. Existe disponibilidad de equipos totalmente automatizados; sus precios son razonables y pueden catalogarse de bajos si se comparan con los datos obtenidos.

Las principales limitaciones de la cromatografía de gases son las siguientes:

- La muestra debe ser volátil.

Muestras no volátiles no pasan a través de la columna. Con la CG es difícil tratar compuestos iónicos, compuestos de elevada polaridad y compuestos de peso molecular superior a 600 (6).

- Es necesario eliminar interferencias.

Muestras como las de orina o agua de río, no pueden inyectarse directamente en una columna de CG. Estas muestras deben purificarse con disolventes, para eliminar las sales y los compuestos de peso molecular elevado.

- Técnica cualitativa deficiente.

No es posible confirmar la identidad de un compuesto debido a que varios compuestos pueden tener los mismos tiempos de retención. Se requiere de otro instrumento, por ejemplo un espectrómetro de masas para confirmación de identidad (7).

- Técnica preparativa deficiente.

La CG funciona bien con microgramos y miligramos de muestra, pero es muy difícil manipular cantidades de un gramo o mayores. Las columnas normales de CG se sobrecargan con muestras de 10 miligramos y las columnas de mayor diámetro no son tan eficientes (6).

2.1.2 Instrumentación.

Los elementos básicos en un sistema para cromatografía de gases son: cilindro de gas acarreador, control del flujo de gas, inyector, termostato de la columna, columna, detector y registrador (figura 2).

- Gas acarreador.

El propósito primario del gas acarreador es transportar los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. El gas deberá ser inerte y de alta pureza. Las impurezas, en especial oxígeno y agua, pueden alterar químicamente la fase líquida y por consiguiente, modificar los tiempos de retención.

- Control del flujo de gas.

El control del flujo de gas acarreador es esencial tanto para la eficiencia de la columna como para el análisis cualita-

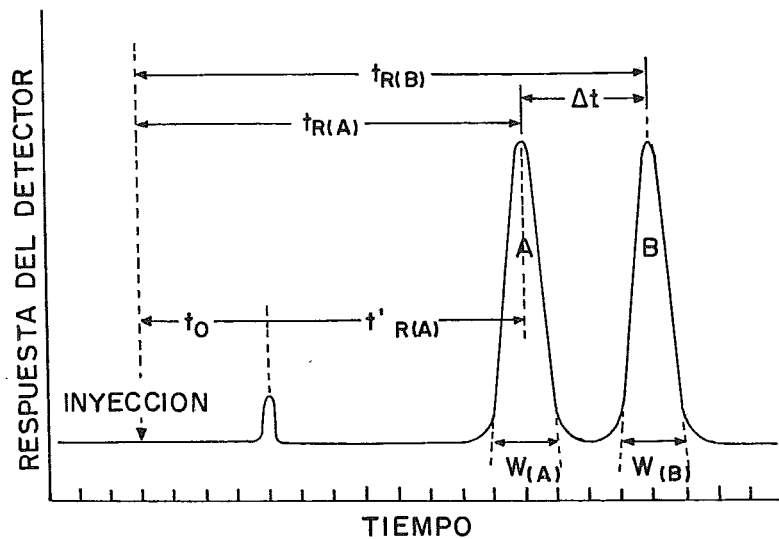


Figura 1
Cromatograma tipico (referencia 6)

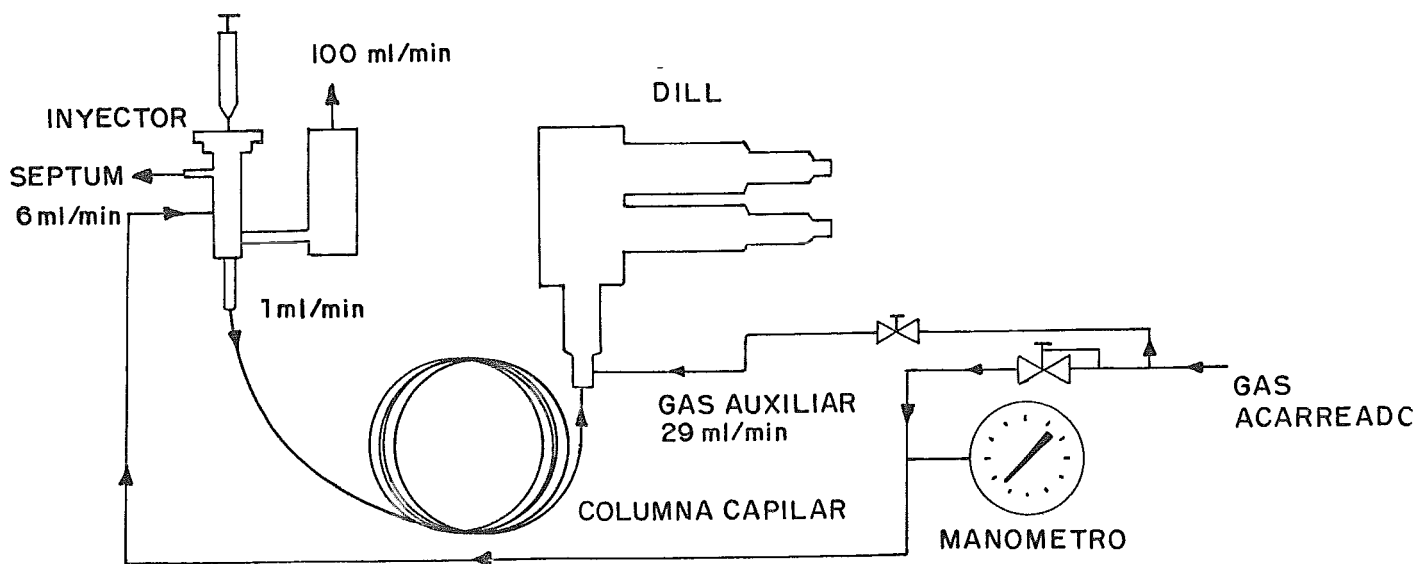


Figura 2
Esquema del "hardware" para CG (referencia 7)

tivo. El flujo óptimo debe determinarse experimentalmente.

Existen diversos mecanismos para el control del flujo de gas, los más sencillos son válvulas de aguja que funcionan como restrictores del flujo o válvulas de diafragma que proporcionan una presión constante a la entrada de la columna. Los controles más complejos son las válvulas diferenciales de flujo, las que proporcionan un flujo másico constante (8).

- Inyector.

La entrada de la muestra deberá permitir la introducción de una amplia variedad de muestra y su mezclado rápido y cuantitativo con la corriente del gas acarreador.

Para conseguir la mejor forma del pico y la resolución máxima deberá usarse la mínima cantidad posible de muestra. Mientras más componentes constituyan la muestra, más grande deberá ser su tamaño.

- Horno para la columna.

El control de la temperatura de la columna es uno de los procedimientos más fáciles y eficaces para promover la separación.

La temperatura de la columna deberá ser suficientemente alta para que el análisis se efectue en un plazo razonable y suficientemente baja para lograr la separación deseada.

La temperatura programada, que es un aumento lineal de la temperatura de la columna con el tiempo, es muy útil para muestras de mezclas con puntos de ebullición muy diferentes; las trazas pueden fácilmente distinguirse de la línea base y el tiempo total de análisis es más corto (7).

- Columna.

El objetivo primario de la cromatografía de gases es la separación, y ésta la efectúa la columna.

El escoger la columna apropiada es la decisión más importante en una buena técnica cromatográfica. La fase líquida es la responsable de lograr la separación de los componentes de una mezcla, actuando como disolvente diferencial.

Para seleccionar una fase líquida, deben tenerse en cuenta los siguientes criterios: eficiencia del disolvente, limitaciones de la temperatura, solubilidad absoluta y la disponibilidad.

Existen dos tipos de columnas:

-- Columnas empacadas.

Convenientes para tratar mezclas simples.

-- Columnas capilares.

Son apropiadas para el tratamiento de mezclas complejas, ya que estas requieren, en general, de alta resolución.

En el inciso 2.1.3 se expondrán en forma amplia las columnas capilares.

- Detector.

Es un dispositivo que indica y mide la cantidad de componentes separados en el gas acarreador.

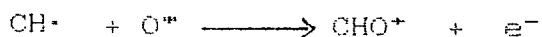
Los detectores pueden ser clasificados como integrales o diferenciales (8).

Se explicará con algún detalle, el detector de ionización de llama (DILL), por ser el utilizado en el presente trabajo.

El funcionamiento del DILL se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a

la concentración de las partículas cargadas dentro del gas. La llama ioniza algunas de las moléculas orgánicas presentes en la corriente gaseosa. La presencia de partículas cargadas origina una corriente, que fluye en el espacio entre los electrodos y a través de una resistencia. La disminución de potencial resultante se amplifica por un electrómetro y se alimenta a un registrador (8).

El mecanismo de producción de iones en llamas es complejo y aún pobremente entendido (2). La energía térmica de la llama es muy baja para explicar la producción de iones y en general se acepta que los compuestos orgánicos son ionizados por un mecanismo de ionización química, en el cual la energía derivada de las reacciones químicas muy exotérmicas es retenida por moléculas orgánicas y conduce a la ionización. Dos etapas se consideran importantes en este proceso de ionización: la formación del radical con ausencia de oxígeno y la ionización química de radicales formados por átomos excitados. Al final de una cadena de reacciones, en las cuales el metano o el radical metilo parecen ser un intermediario clave, la reacción que ocurre se muestra a continuación:



Como una consecuencia del mecanismo del DILL, cada átomo de carbono capaz de hidrogenarse, produce la misma señal y la respuesta total del detector a la sustancia analizada es proporcional a la suma de estos átomos de carbono "efectivos". La respuesta es mayor para hidrocarburos, siendo proporcional al número de átomos de carbono; en tanto que sustancias que

contienen nitrógeno, azufre o halógenos producen las menores respuestas, dependiendo del carácter heteroátomo-carbono y de la afinidad electrónica de los productos de combustión. La respuesta producida puede ser explicada por series complejas de reacciones de recombinación y procesos de captura de electrones resultando en una corriente de ionización más baja. Para un detector que opera bajo condiciones óptimas, la cantidad mínima detectable de metano está en el rango de 10^{-11} a 10^{-12} g/s.

El DILL responde a los compuestos orgánicos. Entre las sustancias que no dan respuesta figuran: aire, agua, gases inertes, CO, CO₂, CS₂, NO, SO₂ y H₂S. Por no responder el aire ni el agua, el DILL es particularmente apropiado para el análisis de trazas de materia orgánica en el aire o en el agua. El comportamiento del DILL, depende de la selección apropiada de la velocidad de flujo gaseoso. Por regla general se usa una relación relativa de flujo de 1:1:10 de hidrógeno/gas acarreador/aire.

El DILL es un detector muy sensible y su intervalo lineal es muy amplio. Por su alta sensibilidad, combinada con su extenso intervalo lineal, es un excelente detector para el análisis cuantitativo de trazas. Las ventajas anteriores, además de su simplicidad de construcción y operación, han hecho del DILL el detector más popular en CG.

2.1.3 Columnas capilares.

En 1957, Marcel Golay mostró teóricamente que un tubo abierto de diámetro interno pequeño, recubierto con una delgada

película líquida sería por lo menos docientas veces más eficiente que una columna empacada (10). Así nació el concepto de columnas de tubo abierto para cromatografía de gases, cuya tecnología se desarrolló en el siguiente cuarto de siglo, lo suficiente para que la técnica fuera ampliamente aceptada (11).

La eficiencia teórica de las columnas empacadas está limitada por la dispersión intrínseca de las moléculas del soluto, asociada con la multiplicidad de la trayectoria del flujo a través del empaque y por diferencias en retención, resultante de la distribución desigual de la fase líquida a través de las partículas. Por el contrario, la eficiencia de una columna de tubo abierto depende solamente de la velocidad de transferencia de masa en la fase líquida. La eficiencia de una columna de tubo abierto sobre una columna empacada puede demostrarse mejor por un ejemplo: el análisis de una muestra de agua de río (2) (figura 3); con claridad la complejidad de la muestra se observa mejor en el cromatograma obtenido con la columna de tubo abierto. Una desventaja de las columnas de tubo abierto es que poseen más baja capacidad de muestra que las columnas empacadas.

Las columnas de tubo abierto son más conocidas como columnas capilares. Sin embargo, la primera denominación describe mejor su principal característica; pero cualquiera de los dos términos es aceptado.

Numerosos materiales se han usado para fabricar columnas capilares: acero inoxidable, níquel, aluminio, cobre, etc. En general las columnas de metal exhiben actividad catalítica y adsorptiva. Los tubos de plástico y nylon son difíciles de recubrir y presentan estabilidad térmica limitada. Columnas de

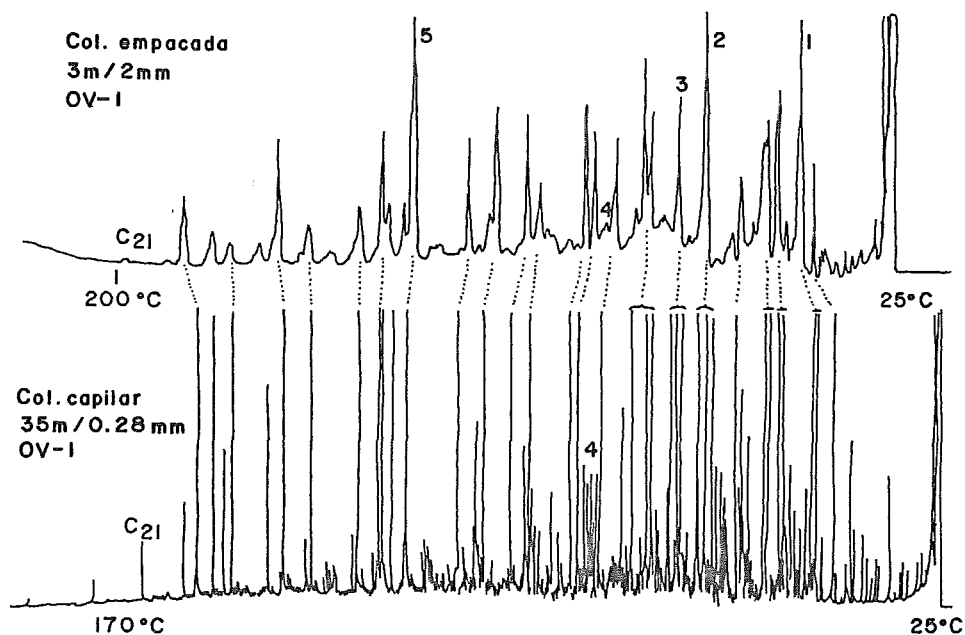


Figura 3

Comparación de una separación típica sobre una columna empacada y una columna capilar.
 Muestra: agua de río. (referencia 2)

teflón modificadas por breve reacción con una solución de naftalato sódico pueden ser recubiertas con fases líquidas polares (12). Ninguno de los materiales citados anteriormente ha encontrado amplia aplicación. En la actualidad, las columnas capilares se preparan de vidrio sódico, borosilicato, o vidrios de sílice fundida. Un hecho importante fue la introducción de columnas de sílice fundida flexible por Dandeneau y Zerenner en 1979.

El mejor componente de los vidrios empleados para preparar columnas capilares es la sílice. La sílice fundida preparada por

hidrólisis térmica del tetracloruro de silicio, es esencialmente sílice pura, conteniendo menos de 1 ppm de impurezas metálicas. La superficie del vidrio de sílice fundida es relativamente inerte, contiene principalmente grupos silanol y siloxano. La presencia de los grupos silanol es responsable del carácter ácido residual del vidrio. Tratamiento con temperaturas altas en una atmósfera inerte pueden reducir la concentración de grupos de silanol a muy bajos niveles (13).

Casi todas las columnas capilares usadas corrientemente son circulares con diámetros internos en el rango de 0.05 a 1.0 mm. La teoría predice que la eficiencia de tales columnas puede incrementarse por inducción con un mezclador radial a lo largo de la trayectoria de flujo para minimizar la contribución de la transferencia de masa en la fase gaseosa al valor de la HETP de la columna. Se han preparado columnas capilares de diversas formas geométricas: helicoidales, ovaladas, cuadradas y serpenteadas (14). Estas columnas son difíciles de recubrir y prácticamente no se ha demostrado su superioridad sobre las columnas capilares circulares.

Uno de los principales problemas en cromatografía de gases se refiere a la elección de la fase estacionaria; de ésta depende en forma importante, la resolución alcanzada.

Para que una sustancia pueda usarse como fase estacionaria en CG debe reunir ciertas características:

- Ser un líquido a la temperatura de trabajo.
- Poseer estabilidad térmica.
- No reaccionar químicamente con los solutos, el soporte o el material de la columna.

- Tener baja presión de vapor a la temperatura de trabajo.

Las fases comerciales en su mayoría son polímeros de alto peso molecular que cumplen con los requisitos mencionados. La selectividad de la fase depende de los grupos funcionales presentes.

Las fases estacionarias en CG pueden agruparse en: silicones no polares y medianamente polares, glicoles, ésteres y ftalatos (15). De acuerdo a este criterio, muy pocas fases presentan selectividades extremas.

Cuando se requiere una selección rápida de la fase estacionaria, se recurre a la clasificación dada por algunos autores (15) y/o que ellos han llamado fases preferidas:

- Dimetil silicón (OV-101, SE-30, SP 2100)
- Fenil metil silicón (OV-17, SP-2250, OV-1701, SE-54)
- Dietilen glicol succinato
- 3-cianopropil silicón (Silar-10C)
- Trifluoropropil silicón (OV-210, QF-1, SP-2401)
- Polietilen glicol, (CW-20M, PEG 20 M)

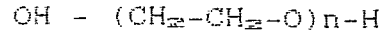
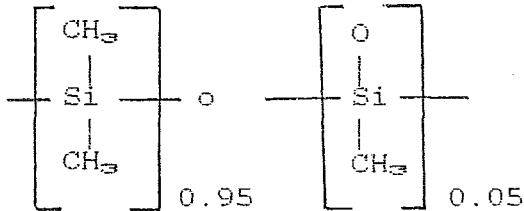
Para el presente trabajo se escogieron las fases SE-54 y Carbowax 20M, ya que la primera pertenece al grupo menos polar y las columnas capilares de la misma son muy eficientes e inertes.

La segunda fase pertenece al grupo más polar y entre ambas representan casi el 80% de las separaciones realizadas por CG.

Sus estructuras se muestran a continuación:

SE-54

Carbowax 20 M



55% polar

T_{lim} 60 - 225°C

T_{lim} 40 - 300°C

2.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

En la preparación de la muestra para el análisis por CG se encaran dos problemas principales. Uno puede llamarse aislamiento que consiste en la separación de los volátiles de interés de las sustancias interferentes, tales como materiales no volátiles. El otro problema es la concentración de las sustancias a analizar, que significa elevar el nivel de éstas a un punto tal que la muestra que se coloca en la columna contenga cantidades detectables de los compuestos de interés. Los métodos usados con más frecuencia en el aislamiento y/o concentración de volátiles involucran técnicas de destilación, extracción y adsorción. Estas etapas pueden causar cambios cuantitativos en las relaciones de las sustancias recuperadas, y algunas pueden causar cambios cualitativos generando nuevos volátiles o desapareciendo los existentes (1). Un punto crítico es que los errores cometidos en las primeras etapas del aislamiento y concentración no pueden ser corregidos en las etapas finales del análisis.

técnicas de enriquecimiento de trazas. La técnica de enriquecimiento puede ser general, por ejemplo: adsorción de sustancias orgánicas del agua, o puede ser selectiva, por ejemplo: la adsorción por intercambio iónico de compuestos ácidos del agua. Este último ejemplo representa enriquecimiento y limpieza de la muestra.

Los adsorbentes comunmente usados son (2), (16): carbón, polimeros porosos macrorreticulares, fases de poliuretano, resinas de intercambio iónico y fases de sílica gel normales e inversas.

2.2.5 Técnica de purga y trampa.

Se usa esta técnica alternativa cuando las sustancias se encuentran en concentraciones bajas y presentan un coeficiente de partición desfavorable.

Cuando se emplea un gas para remover las sustancias orgánicas volátiles de un líquido, la velocidad a la cual una sustancia es removida de la solución está dada por la siguiente ecuación (2), (17):

$$\frac{W_B}{W_{B^0}} = \exp - \frac{F \cdot t}{V_G + K_B V_L} \quad (2-1)$$

W_B = Cantidad de muestra en un instante dado

W_{B^0} = W_B al inicio del experimento

F = Velocidad de flujo del gas de arraste

V_G = Volumen del gas que pasa a través del líquido en el tiempo t .

V_L = Volumen de muestra

t = tiempo de arrastre

Este método es una extensión del análisis "Head space" (ver 2.2.7). Un flujo continuo de gas es barrido sobre la superficie de un líquido, llevando los volátiles a una trampa donde son acumulados para análisis posterior. Este método se usa rutinariamente en laboratorios que disponen de equipo automatizado. En general se elige para la determinación de volátiles orgánicos en agua. Esta técnica presenta ciertas desventajas, por ejemplo, contaminación cruzada cuando se analizan muestras de diferente concentración; la presencia de impurezas en el gas de purga; y el acoplamiento del sistema trampa-purga al cromatógrafo de gases.

2.2.6 Pirólisis.

La pirólisis acoplada a CG es un método que emplea calor para transformar un compuesto en una serie de productos volátiles, que son característicos del compuesto original. Las reacciones iniciales involucradas en la mayoría de los materiales orgánicos se llevan a cabo por generación de radicales libres al romperse un enlace sencillo o por la eliminación unimolecular de moléculas simples como agua o dióxido de carbono. Las reacciones subsecuentes de estas especies, generalmente por reacciones de combinación, dan productos característicos de la muestra original.

La pirólisis acoplada a cromatografía de gases tiene aplicaciones en química de polímeros, geoquímica y análisis biomolecular (18). Se conocen tres métodos de pirólisis: modo continuo, modo pulsado y desintegración laser (19).

2.2.7 Técnica de muestreo de vapor confinado "Head space".

2.2.7.1 Generalidades

Esta técnica se expone en detalle por considerarse muy importante para el presente trabajo.

Es un método indirecto en el cual, la muestra se encuentra en un sistema cerrado y la fase vapor que está en equilibrio térmico con ella, se analiza por cromatografía de gases.

La mayoría de los aromas naturales y sintéticos son una mezcla compleja de compuestos volátiles. El aroma depende de las sustancias químicas presentes, como también de sus cantidades relativas y absolutas. Sin embargo, un compuesto volátil presente a nivel de trazas puede ser un contribuyente significativo del sabor y del aroma. La cromatografía de gases es usada rutinariamente en la caracterización del sabor y del aroma de compuestos, con el objeto de: -Identificación de volátiles en materiales que ocurren en forma natural. -Caracterización de nuevos compuestos potencialmente útiles con relación al aroma. -Conservación del aroma y del sabor en alimentos y productos de consumo. -Determinación de la fuente de sabores y aromas indeseables en determinados productos (20).

La mayoría de las técnicas de pretratamiento, consumen tiempo y requieren el uso de solventes, (los cuales pueden con frecuencia introducir impurezas) y no son fácilmente automatizadas. Por rapidez, simplicidad, precisión y automatización: el análisis "Head space" es el método seleccionado. Un hecho distintivo de la técnica "Head space" es que la información química contenida en la fase gaseosa se usa para determinar la

naturaleza y composición de la fase condensada con la cual está en contacto (21).

El desarrollo de métodos "Head space" abre extensas posibilidades para la determinación de trazas de contaminantes en la atmósfera, en otros medios gaseosos y en otras sustancias. Las características del método "Head space" lo hacen en muchos casos irremplazable y muy efectivo.

Existen métodos "Head space" basados en el muestreo del vapor encerrado en un sistema estático. Una interesante e importante perspectiva es la transición al análisis cromatográfico de la fase gaseosa en sistemas abiertos, ésto es, el análisis del gas que fluye a través de una solución analizada (21).

La variación inversa, equilibrio de concentración de microimpurezas de gases sobre fases estacionarias cromatográficas, fue propuesto independientemente por analistas checoslovacos y americanos (22).

Los métodos clásicos para el aislamiento y concentración de componentes volátiles han sido revisados por Weurman (23). Weurman indica que el contenido de volátiles totales de una sustancia está relacionado con la composición de los volátiles "Head space" de esa sustancia, por la distribución de esos compuestos en el interior de la misma y además por su estado físico. La figura 4 de la página 34, ilustra este punto. Aún cuando la cantidad total de volátiles es cualitativa y cuantitativamente la misma en los dos ejemplos, las presiones de vapor de los componentes y sus concentraciones en el "Head space" son diferentes, debido a que la distribución de los componentes no es

la misma. La inyección directa de un gas "Head space" tiene una simplicidad atractiva y para muchas muestras puede llevar a resultados satisfactorios (1). Desafortunadamente solo las sustancias cuyas presiones de vapor son suficientemente altas, ésto es, si están presentes en el "Head space" en cantidades apreciables para activar el detector, entonces producirán picos. Aunque una inyección "Head space" grande contendría gran cantidad de materiales menos volátiles, las inyecciones grandes no son consistentes con las bandas de solutos y los picos, ya que producen ensanchamiento de bandas, picos traslapados y pobre resolución.

Son muchas las ventajas de la técnica "Head space", las cuales hacen que ésta sea más atractiva que los métodos alternativos para el análisis del aroma (20). Las ventajas más importantes son:

- Se minimiza la preparación de la muestra o se elimina del todo. La técnica es aplicable a sólidos, líquidos, emulsiones, pastas y mezclas de fases; las cuales son simplemente pesadas o pipeteadas en un vial de 12 a 22 ml. Se eliminan destilaciones y extracciones.
- Las muestras pueden ser equilibradas a temperaturas desde cerca de la temperatura ambiente hasta 150°C, permitiendo al químico escoger la temperatura, la cual da la mayor sensibilidad evitando la degradación de la muestra.
- El pico del solvente, el cual con frecuencia interfiere con los volátiles de interés, es generalmente eliminado del todo, no hay necesidad de introducir solventes en ninguna etapa del análisis.

- El análisis "Head space" resulta en un "aromagrama" más real, es así como los componentes volátiles detectados por muestreo "Head space" están en la misma proporción relativa, como son detectados por el olfato.
- Debido a que la muestra entera es volátil, los tiempos de análisis son más cortos y las columnas más largas. Con muestreo "Head space" es poco frecuente trabajar cerca de la temperatura límite de las columnas.
- El acoplamiento de los sistemas "Head space"-cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-CG-EM), constituye una herramienta poderosa para la identificación de volátiles en cualquier muestra.
- Los análisis cuantitativos pueden ser ejecutados por los métodos usuales (estandar interno, estandar externo, adición estandar) o por extracción "Head space" múltiple (24), (25). Hay varias formas de mejorar la sensibilidad del método de muestreo "Head space":
 - Ajustando el pH de la solución de manera que el analito exista principalmente en la forma no disociada, porque la concentración del analito en la fase gaseosa, es proporcional a la concentración de la parte no disociada en solución (26).
 - Usando el efecto salino por adición de una sal inorgánica a una solución acuosa, o un no electrolito como el agua a un solvente orgánico miscible.
 - Por último, elevando la temperatura de la muestra para que aumente la presión de vapor del analito y por lo tanto su concentración en la fase gaseosa.

2.2.7.2 Principios básicos del análisis "Head space".

Los principios de los métodos de análisis cuantitativo "Head space" se basan en condiciones termodinámicas de las fases. Estas condiciones requieren de la existencia de ciertas interrelaciones entre las concentraciones de cada uno de los componentes en diferentes fases de cualquier sistema heterogéneo que esté en equilibrio (21). En particular, el equilibrio de distribución de la sustancia entre las fases coexistentes de cada i componentes en cada j fases de equilibrio se describe por la igualdad de potenciales químicos:

$$\mu_i^1 = \mu_i^2 = \dots = \mu_i^j \quad (2-2)$$

Pero el potencial químico del i -ésimo componente en la j -ava fase es una función de su concentración C_i^j en la fase dada (más correctamente de su composición). Así de (2-2), se desprende que debe existir cierta dependencia entre las concentraciones de cada componente en equilibrio con las fases I y II.

$$C_i^I = f_{i^{I,II}}(C_i^{II}) \quad (2-3)$$

La relación (2-3) puede servir como base para establecer la composición de una de las fases. Los índices de la función $f_{i^{I,II}}$ reflejan la dependencia de C_i^I y C_i^{II} con la naturaleza de un componente dado i y la correlación con las fases I y II. Es necesario tomar en consideración que los valores de $f_{i^{I,II}}$, los cuales son una función de la composición de las fases, dependen también de parámetros de equilibrio como temperatura y presión (para las fases condensadas esta dependencia es menos

pronunciada), y del método de expresión de concentración.

En general, para propósitos analíticos, no es necesario establecer la forma de la función f , porque se puede usar estandarización empírica por gráficas computacionales o tablas bajo condiciones estrictamente especificadas. Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones modernas "Head space", en la determinación de impurezas en bajas concentraciones, el caso más simple de dependencia funcional $f(C)$, adquiere una especial importancia, una proporcionalidad directa entre concentraciones del componente dado en el equilibrio de fases:

$$C^I = KC^{II} \quad (2-4)$$

El coeficiente de proporcionalidad K es llamado coeficiente de distribución, y está determinado por los mismos factores que influyen en los valores de la función $f(C)$, los cuales se dieron anteriormente. La ley más simple de distribución (2-4) es válida en muchos sistemas heterogéneos diferentes, independiente del conjunto de condiciones de las fases; además bastante limitado con respecto a la relación universal (2-3) por efecto de la dependencia de la concentración de los potenciales químicos. Expresando los potenciales químicos de los componentes a través de sus fracciones mol X_1 , y coeficiente de actividad γ_1 ,

$$\mu_1 = \mu_1^\circ + RT \ln (\gamma_1 X_1) \quad (2-5)$$

y resolviendo para las fases I y II en términos de (2-2), se obtiene:

$$\mu_1^{\circ I} + RT \ln (\gamma_1^I X_1^I) = \mu_1^{\circ II} + RT \ln (\gamma_1^{II} X_1^{II}) \quad (2-6)$$

$$\ln \frac{\gamma_{iI} X_{iI}}{\gamma_{iII} X_{iII}} = \frac{\mu_{iII} - \mu_{iI}}{RT} \quad (2-7)$$

El término de la derecha, el cual contiene la diferencia entre los valores estandar de los potenciales químicos del i-ésimo componente en las fases I y II, es una constante a temperatura y presión dadas. En consecuencia, la relación de actividades $\gamma_{iI} X_{iI}$ en diferentes fases también debe ser constante.

$$\frac{\gamma_{iI} X_{iI}}{\gamma_{iII} X_{iII}} = K_a \quad (2-8)$$

La relación de las fracciones mol X_{iI}/X_{iII} guardará su integridad solamente si los coeficientes de actividad permanecen uniformes ($\gamma_{iI} = \text{constante}$), como en diluciones máximas y soluciones ideales. En el último caso, $\gamma_{iI} = 1$ sobre todo el intervalo de concentraciones 0 a 1.

Así, la ley de distribución toma la forma:

$$X_{iI} = K_{aI} X_{iII} \quad (2-9)$$

que será usada sin limitaciones de concentraciones solamente en sistemas heterogéneos, en los cuales las fases puedan ser consideradas como soluciones ideales. En soluciones reales, la consistencia de la relación de concentraciones X_{iI}/X_{iII} se mantiene en tanto que $X_{iI} \rightarrow 0$.

Es convencional en el método de análisis "Head space" considerar la fase líquida o sólida, cuya composición debe ser determinada como fase I y la fase gaseosa, como fase II.

2.2.7.3 Instrumentación para el análisis "Head space".

La operación que determina la exactitud del análisis cuantitativo, es la introducción del gas que está en equilibrio con la fase condensada (líquido o sólido) dentro de la columna cromatográfica. Este proceso difiere bastante de los métodos comunes de introducción de muestras gaseosas (21). La condición obligatoria de preparación de la muestra para el análisis es el mantenimiento de una temperatura constante y altamente reproducible en el recipiente de equilibrio. Además, el proceso de introducción de muestra debe asegurar que no haya pérdida de la sustancia en la fase gaseosa del recipiente. El método seleccionado para la introducción del gas debe asegurar que el equilibrio en el sistema se mantenga y que no haya pérdida de las sustancias analizadas, debe darse atención especial a la posibilidad de la condensación de los vapores saturados sobre las conexiones en el sistema de flujo del gas, las cuales están a temperaturas más bajas que la de la solución investigada. Los cambios en la presión pueden llevar a pérdida del equilibrio en el sistema y el correspondiente cambio de la concentración de los componentes analizados en la fase gaseosa. Los dispositivos usados en las variaciones estáticas del análisis "Head space" para introducción del gas dentro del cromatógrafo, se dividen en dos grupos básicos. Un tipo, usa recipientes a volumen constante para el establecimiento del equilibrio. Las muestras tomadas de esos recipientes son generadas a presiones variables. El otro tipo de dispositivo se aplica a sistemas de volumen de fase gaseosa variable y el muestreo se lleva a cabo a presión constante. El

principio de presión constante se realiza en aplicaciones prácticas en todas las variaciones dinámicas del análisis "Head space". Cada uno de estos tipos de dispositivos tiene ciertas ventajas y limitaciones que deben ser consideradas cuando se selecciona el método de preparación de muestra, tipo de análisis cuantitativo y método de introducción de la muestra gaseosa dentro del cromatógrafo. Estas consideraciones dependen de las condiciones analíticas reales (volatilidad del solvente, magnitud y constancia del coeficiente de distribución en diferentes muestras, sensibilidad requerida, exactitud del análisis, etc).

En los sistemas estáticos, la introducción directa del gas en equilibrio dentro del cromatógrafo desde un recipiente de volumen constante, puede realizarse por varios métodos:

- Muestreo con una jeringa de gases, seguida por la introducción de la muestra dentro de la cámara de vaporización del cromatógrafo. La temperatura de la jeringa debe ser igual o más alta que la del recipiente de equilibrio (27).
- Introducción de la muestra dentro de la columna cromatográfica a través de una válvula de muestreo de gas (figura 5), se usa una jeringa hipodérmica como bomba y se conecta a la salida de la válvula.
- Introducción neumática del gas de equilibrio: es efectuada por admisión de un gas inerte dentro del recipiente de equilibrio y desarrollo de una presión mayor que la del inyector de la columna cromatográfica (figura 6).

Para compensar la disminución de la presión en el sistema que ocurre cuando se toma la muestra, puede adicionarse un líquido a recipientes de volumen constante (figura 7). El

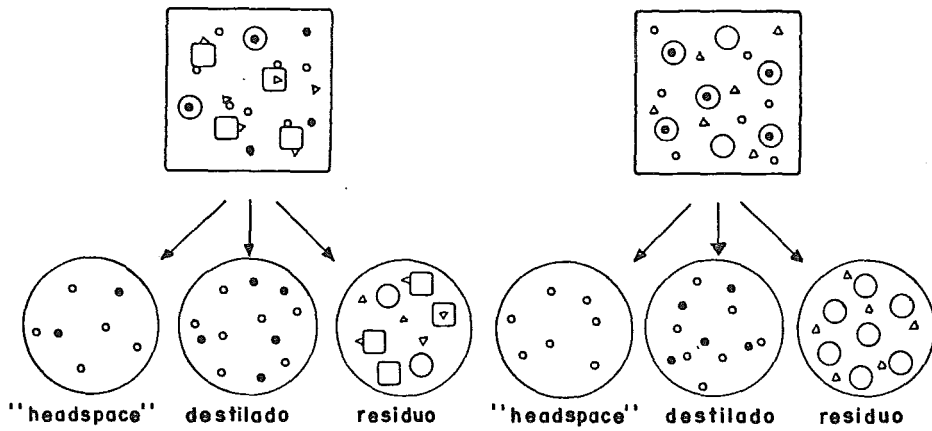


Figura 4

Relación entre "headspace" y la composición de la muestra

• solutos volátiles polares; • solutos volátiles no polares; ▲ solutos no volátiles; ○ materiales lípidos no disueltos; □ sólidos. (referencia 1)

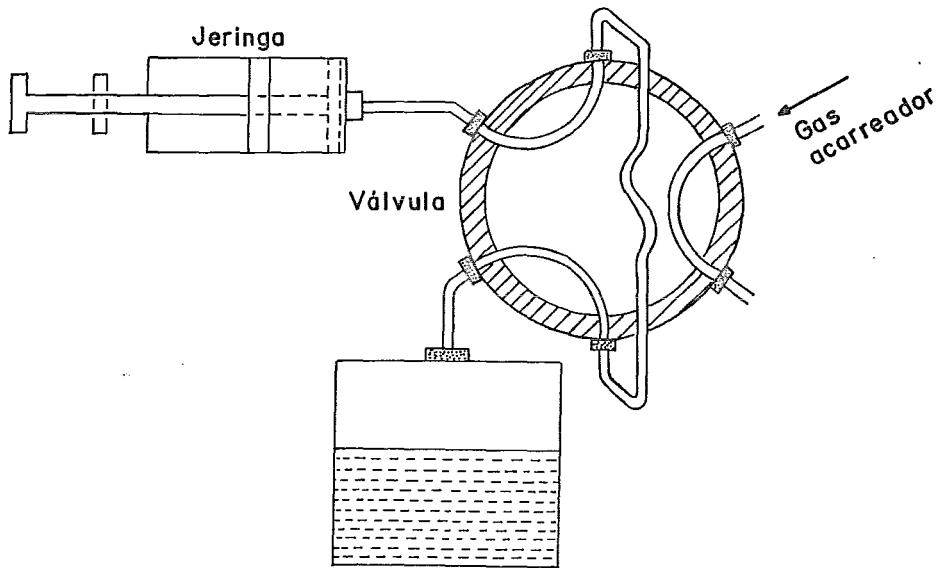


Figura 5

Válvula de muestreo de gases (referencia 21)

contenido del recipiente cerrado se lleva a presión atmosférica, usando un líquido que fluye de un recipiente auxiliar que está abierto a la atmósfera. En este sistema, la presión atmosférica es lograda igualando los niveles del líquido.

Debido a su simplicidad y bajo costo, con frecuencia se usan viales de vidrio de 5-40 ml, sellados con un tapón de hule, como recipientes de volumen constante. El muestreo y la inyección del gas dentro del cromatógrafo, son llevados a cabo con una jeringa hermética de gases. Estos últimos instrumentos fueron los usados en el presente trabajo.

En la actualidad existen instrumentos automatizados para análisis "Head space".

2.2.7.4 Aplicaciones del análisis "Head space".

Una de las aplicaciones se refiere a la investigación de productos alimenticios, en la cual, el análisis "Head space" es particularmente útil para la determinación de:

- Sustancias peligrosas como contaminantes de los productos alimenticios crudos o que se desarrollan durante el almacenaje.
- Componentes volátiles de los productos alimenticios que son responsables de sus característicos aroma y sabor.

Con más frecuencia, el análisis "Head space" se usa para café, té, cocoa, frutas, cerveza, vino y otras bebidas alcohólicas.

Otra de las aplicaciones importantes de la técnica "Head space", se refiere al estudio del perfil cromatográfico de

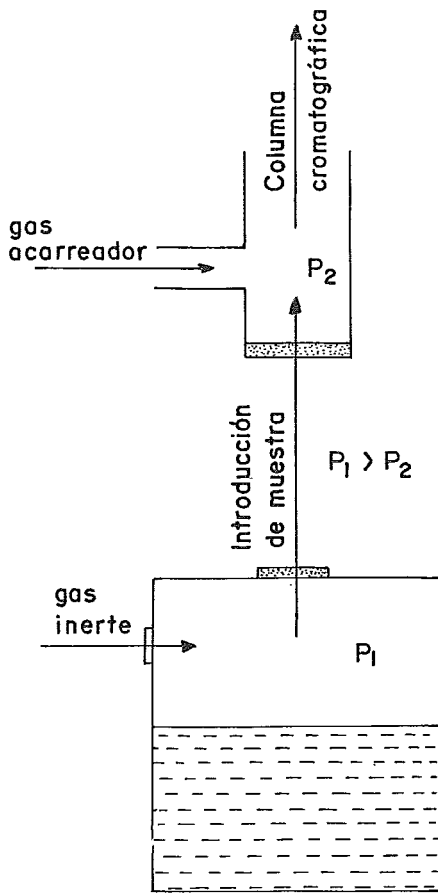


Figura 6

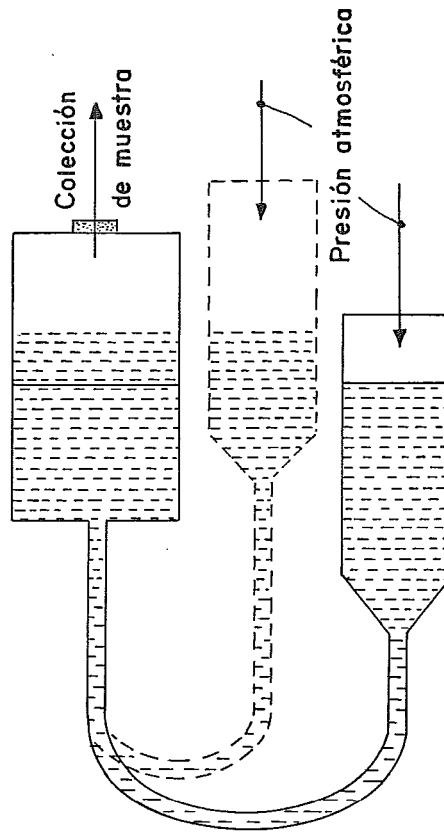


Figura 7

Fig.6. Inyección neumática del gas de equilibrio dentro de un cromatógrafo de gases.(referencia 21)

Fig.7. Muestreo de gases de un sistema con volumen de gas variable a presión constante.(referencia 21)

mezclas complejas relacionado con el análisis de olores (21).

El término "perfil cromatográfico" en el análisis de sustancias complejas, significa una combinación de datos acerca del número, posición relativa, intensidad y forma de los picos percibidos.

Olores similares pueden contener compuestos de diferente estructura. Así, presentan el mismo olor algunas cetonas cíclicas, algunos compuestos nitroaromáticos y ciertos esteroides. Pequeños cambios en la estructura molecular, influyen en forma importante en la intensidad y carácter de un olor (los olores de los estereoisómeros por ejemplo, son completamente diferentes). Con tales relaciones complejas y ambiguas entre la estructura y el olor, la determinación de la estructura de un componente y la identificación del pico cromatográfico, necesaria para el reconocimiento de odorantes conocidos, son insuficientes para estudios de sustancias poco conocidas y para la previa determinación de sustancias odoríferas desconocidas.

Mientras se realiza la separación cromatográfica de los componentes volátiles de la fase gaseosa para la investigación de los olores, se puede llevar a cabo la evaluación sensorial del olor de las fracciones eluidas (28). Por esta razón, una porción de la corriente de gas que viene de la columna cromatográfica, es vertida dentro de un dispositivo de inhalación colocado paralelamente al detector.

La evaluación del olor, es hecha especialmente por expertos entrenados, quienes consideran un gran número de factores que afectan la percepción subjetiva del olor bajo condiciones estrictamente reguladas, asegurando máxima sensibilidad y

exactitud. Como un ejemplo típico de una investigación de este tipo, se considera el análisis cromatográfico de gases de los vapores de café con evaluación sensorial simultánea de los componentes volátiles (29). El perfil cromatográfico de la fase de vapor del aroma del café, muestra que la mayoría de los componentes volátiles poseen solo vestigios del aroma del café, los cuales son caracterizados por expertos como olores "acidicos", "dulces" y "quemados". El olor del "café", se notó solo en la última fracción del eluato, saliendo a temperaturas de aproximadamente 230°C y conteniendo tan insignificantes cantidades de odorantes, que no fueron registrados por el detector de ionización de llama, en un concentrado de 50 g de café. Este ejemplo ilustra, la ausencia de una correlación bien definida de los perfiles de los componentes volátiles con los datos olfatómétricos. Sin embargo, si la separación cromatográfica es precedida por una liberación de ciertos componentes de un olor complejo que son químicamente similares, entonces los cromatogramas de tales fracciones de odorantes son más fácilmente interpretados y muy informativos.

El análisis "Head space" se ha usado para el estudio del olor de muchos productos alimenticios, bebidas, fragancias y esencias.

Además de las aplicaciones mencionadas del análisis "Head space", se pueden citar las siguientes:

- Análisis de agua y soluciones acuosas.
- Determinación de sustancias orgánicas volátiles en sistemas biológicos.
- Determinación de sustancias volátiles en polímeros.

- Calibración de instrumentos cromatográficos de gases.
- Determinación de constantes de ionización de sustancias orgánicas en soluciones.
- Determinación de coeficientes de actividad.
- Determinación de pesos moleculares.
- Análisis en microbiología y diagnósticos médicos.

2.3 CROMATOGRAFIA DE GASES BIDIMENSIONAL (CGBD).

2.3.1 Generalidades.

El análisis de muestras complejas en áreas como productos naturales, biomedicina y química ambiental, continuamente desafían al analista. A medida que se requiere más información detallada en estas áreas, nuevas técnicas se han desarrollado. En un comienzo, la cromatografía de gases con columnas empacadas fue desarrollada como un instrumento de separación y cuantificación de los componentes mayoritarios en una mezcla. La cromatografía de gases capilar y la cromatografía de gases capilar/-espectrometría de masas (CGC/EM) fueron técnicas subsecuentemente desarrolladas, de acuerdo a las necesidades de separación, identificación y cuantificación, tanto de componentes mayoritarios como minoritarios en una mezcla compleja. Debido a que fue requerida resolución adicional para muchas muestras complejas, se desarrolló la cromatografía de gases bidimensional (CGBD).

En la literatura podemos encontrar varios arreglos de CGBD, donde más de un detector o columna están involucrados. El tipo de arreglo que con más frecuencia se designa como bidimensional,

involucra una instrumentación que utiliza dos sistemas de separación cromatográfica controlada, los cuales están basados sobre el mismo principio físico.

Para calificar un arreglo en cromatografía de gases como bidimensional, tiene que estar basado en cualquiera de los siguientes principios (30):

- Dos columnas de diferente selectividad acopladas con un sistema (integración, identificación por EM, etc), que permita asignar índices de retención.
- Dos columnas de diferente selectividad que posean un mecanismo (tubo de colección, válvulas, etc), que permita la transferencia selectiva de algunos picos del cromatograma de una columna a otra.

Es posible efectuar muchas variaciones, pero en principio todos los procedimientos e instrumentos bidimensionales caen dentro de los dos puntos anteriores.

2.3.2 Proceso de división de muestra "Heart cutting".

Este proceso es la transferencia de uno o más grupos seleccionados de picos de compuestos eluidos de una columna cromatográfica de gases a una segunda columna.

Un sistema capaz de llevar a cabo las funciones de "heart cutting" requiere la siguiente instrumentación (30), (Figura 8):

- Una columna para separación preliminar.
- Un detector para monitoreo del eluyente de la precolumna (detector de la precolumna).
- Un dispositivo para transferencia cuantitativa y selectiva

del eluente de la precolumna a la columna analítica.

- Una columna analítica con características cromatográficas diferentes de la precolumna (ejemplo, una fase estacionaria distinta).
- Un detector para monitoreo del eluente de la columna analítica.

El sistema ideal incluye un detector selectivo, como un espectrómetro de masas y la capacidad para introducir directamente la muestra dentro de las columnas.

La elección de columnas para estos sistemas puede lograrse por combinación de columnas empacadas y capilares:

- Precolumna empacada y columna analítica empacada.
- Precolumna empacada y columna analítica capilar.
- Precolumna capilar y columna analítica capilar.

El objetivo general es que la columna analítica presente una fase de polaridad diferente a la de la precolumna, lo cual incrementa la separación. Dos columnas empacadas tienen así, mayor poder de separación que una sola columna capilar (31).

Las dos áreas de mayor aplicación del proceso "heart cutting" son: el análisis de mezclas complejas y la determinación de trazas de componentes (32). En el caso de mezclas complejas, grupos de compuestos que muestran pobre resolución o no son resueltos en forma total en la primera columna, son transferidos selectivamente a una segunda columna de diferentes características.

En el análisis de trazas, la columna es con frecuencia sobrecargada con el componente mayor para obtener suficiente

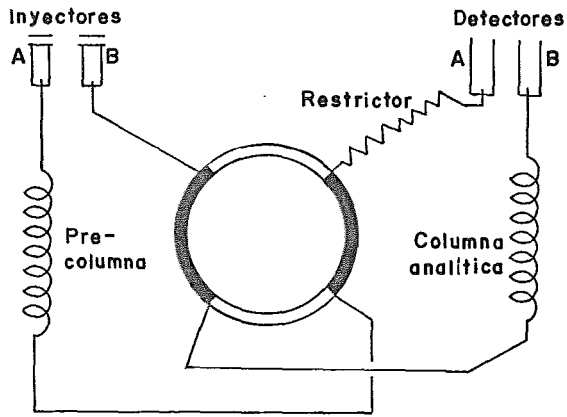


Figura 8

Trayectoria de flujo del gas con una válvula rotatoria.
 (referencia 30)

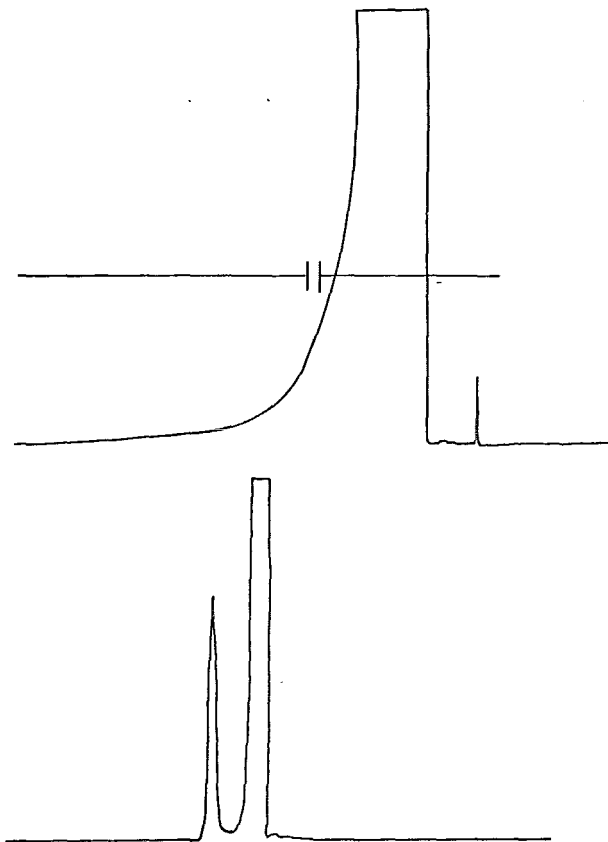


Figura 9

"heart cutting" para medir un componente en trazas
 localizado sobre la cola de un pico. (referencia 31)

señal del componente en trazas; a menudo hay dificultad cuando el pico de la traza sale sobre la cola del pico mayor. Un mejoramiento sustancial en la separación puede hacerse incluyendo un corte a la mitad del pico o un poco más abajo. Por lo tanto, solo una pequeña cantidad del componente mayor es transferido con el componente traza a la segunda columna. La sobrecarga y coleo sobre la segunda columna es así eliminada o muy reducida (figura 9).

Aunque pueden usarse dos columnas empacadas, en la mayoría de los casos, con fines "heart cutting", no siempre proveen suficiente poder de separación, por ejemplo, con mezclas muy complejas. Cuando ésto sucede, debe escogerse la técnica para resolver el problema. Algunas alternativas se mencionan a continuación. Los siguientes sistemas involucran "heart cutting" en esquemas bi y tridimensionales. Estos sistemas se anotan en orden de poder resolutivo (31). La selección de la técnica depende de la naturaleza del problema y de la experiencia y equipo disponible en el laboratorio.

- Una primera columna empacada seguida por una capilar, tiene la ventaja de que se puede introducir una muestra grande.
- Una primera columna capilar seguida por una empacada, requiere un sistema de control de gas ligeramente diferente en la conexión, para mantener una alta eficiencia.
- Dos columnas capilares con una conexión diseñada para mantener una alta eficiencia.
- Dos columnas capilares con trampa en el inyector de la segunda columna seguida por vaporización rápida para dar una inyección neta sobre la segunda columna.

- Tres o más columnas empacadas. Este ya es un sistema multidimensional, un buen ejemplo de éste es el análisis de parafinas-nafteno-aromáticos (PNA) que es usado en forma rutinaria en la industria petrolera europea.

Una revisión de la literatura indica que el proceso "heart cutting" ha sido utilizado desde 1950 en cromatografía de gases. En ese tiempo, las fracciones eran transferidas de la precolumna a la columna analítica con válvulas rotatorias. Estos sistemas tenían sus limitaciones:

- Volúmenes muertos, los cuales reducen la eficiencia.
- Uso de metales, lubricantes y plásticos, componentes que causan adsorción.
- Temperaturas limitadas debido a los materiales empleados.

En 1968, Deans introdujo el sistema del eluyente controlado por flujo neumático (32). La precolumna y la columna analítica se conectaban en serie. Los flujos del gas de arrastre eran controlados directamente en el inyector de la precolumna y en la intersección de las columnas. En la intersección de las columnas había un línea de salida al detector de la precolumna con un control de flujo variable. En el proceso de "heart cutting", la muestra no estaba en contacto con ninguna válvula, debido al control de presión, las fracciones iban directamente al detector de la precolumna o a la columna analítica.

A partir del momento en que Deans introdujo su sistema, han sido muchos los adelantos en el campo de la CGBD. La introducción de las columnas capilares de sílica fundida por Dandeneau y Zerenner representó un gran adelanto en la tecnología de

columnas, ya que las columnas preparadas con sílica fundida son insuperables en inercia, durabilidad y flexibilidad.

La operación de un sistema típico "heart cutting" en CGBD, incluye tres procedimientos generales:

- La separación inicial de la muestra se realiza en la precolumna sin transferencia del eluyente a la columna analítica.
- Después de la determinación de las ventanas del tiempo de retención para los solutos que deben ser transferidos a la columna analítica, la muestra se reinyecta en la precolumna.
- Después de la división completa, la separación final ocurre en la columna analítica.

2.3.3 Instrumentación.

La instrumentación que se utiliza en esta técnica, fluctúa desde arreglos muy elementales hasta sistemas altamente complejos y automatizados. En el caso más simple, solo se requiere un cromatógrafo de gases con un inyector, un detector, dos columnas de diferente selectividad y algún arreglo para la recolección de las fracciones.

A continuación se presentan diferentes arreglos en CGBD.

2.3.3.1 CG en dos instrumentos con transferencia de muestra manual.

El método más simple de resolver un compuesto de una mezcla compleja es por cromatografía en una columna A, recolección de la fracción que contiene la sustancia de interés y reinyección

dentro de una columna B (las columnas A y B poseen diferente selectividad). Este es un método muy común, el cual es particularmente atractivo si la sustancia en cuestión es la de mayor proporción en la muestra. El método sin embargo, es menos adecuado para pequeñas cantidades y puede requerir demasiado tiempo. Generalmente se usan columnas empacadas.

2.3.3.2 Conexiones con válvulas mecánicas.

La manera más simple de conectar el flujo desde una columna a otra es a través de una válvula mecánica. Estas deben ser químicamente inertes, resistentes a todas las temperaturas, operar sin lubricantes y poseer dimensiones internas pequeñas. Las válvulas miniaturizadas han facilitado el análisis con columnas empacadas y capilares; las válvulas microport son especialmente útiles, ya que varias columnas pueden conectarse en forma simultánea a modo de contraflujo.

Cuando solo unos cuantos componentes requieren ser tratados por análisis bidimensional, una válvula en línea ofrece una solución rápida y simple.

2.3.3.3 Conexión neumática del soluto.

Como se mencionó antes, en 1968 Deans introdujo las conexiones neumáticas a la cromatografía. Estas se basan en el balance de flujos a través de restrictores en la línea (32). La dirección del flujo puede cambiarse a voluntad, abriendo y cerrando las válvulas externas. La figura 10 muestra, una representación de la mayoría de los arreglos fundamentales, desde el

diseño clásico de Deans.

En estas conexiones se requiere que los controladores de la presión sean muy reproducibles, Una aplicación de estas conexiones es la transferencia secuencial del eluente desde la primera columna, actuando como inyector, hasta la segunda columna de diferente selectividad. Este método, el cual ha sido llamado "fragmentación en situ", permite "almacenar" componentes en la primera columna (figura 11).

Un resumen de los métodos en CG de alta eficiencia con técnicas bidimensionales se presenta en la figura 12.

2.3.4 Capacidad de resolución de la CGBD.

Como una ilustración de la alta capacidad de resolución de la cromatografía bidimensional, se analiza el siguiente caso:

Se ha encontrado que el sistema bidimensional CG/EM en columnas capilar-capilar, presenta las mayores ventajas en el análisis de mezclas complejas. J.F. Elder y B.M. Gordon examinaron estas ventajas para una muestra de humo de tabaco (33).

En la parte superior de la figura 13, se encuentra el cromatograma obtenido en una columna capilar, en él se observan 300 picos. En la parte inferior de la misma figura se muestra la amplificación de una sección del cromatograma. Al analizar los espectros de masas, se encuentran mezclas; de esto se deduce que la pureza de los picos obtenidos no es suficiente. Solo se puede proponer la posible estructura para el pico E.

Estos resultados se comparan con los obtenidos por CGBD. Esta misma región A a E, se extrae de una primera columna y se

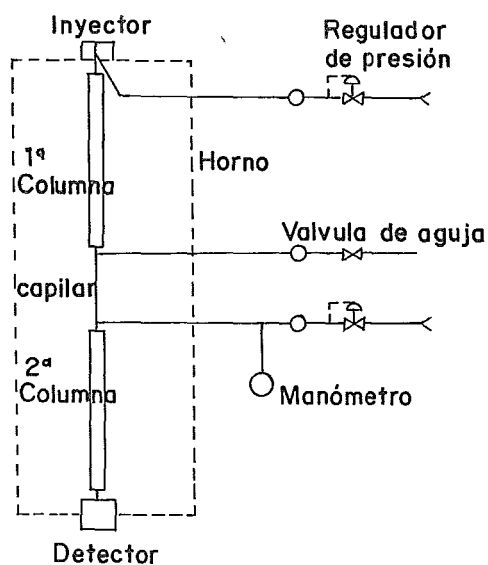


Figura 10
 Conexión neumática en cromatografía de gases bidimensional
 (referencia 32)

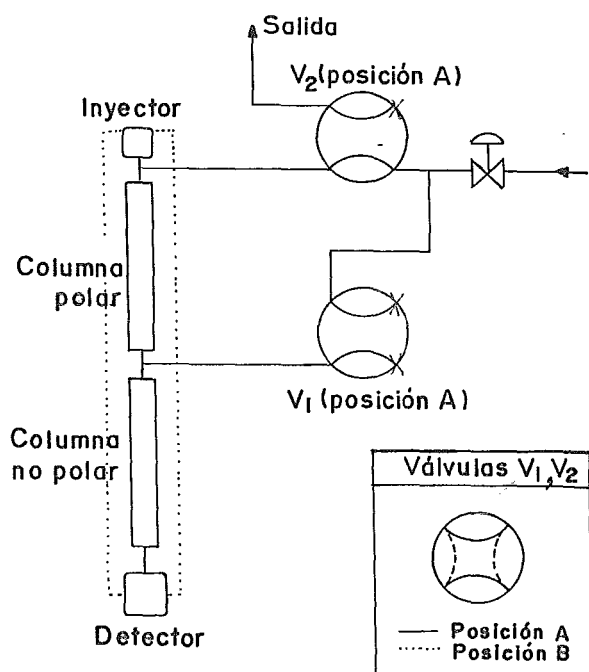
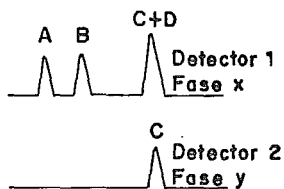
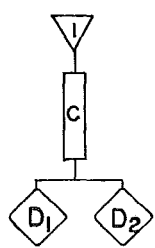
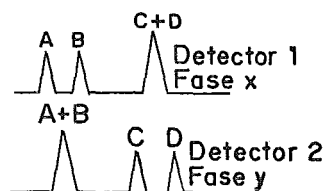
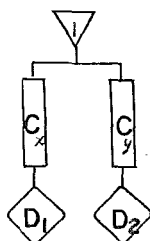


Figura 11

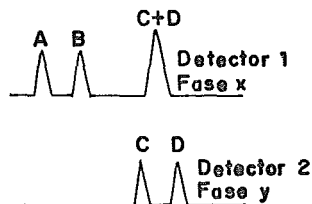
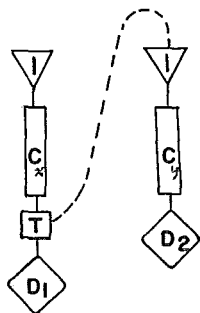
Diagrama del aparato de fragmentación in situ. (referencia 32)



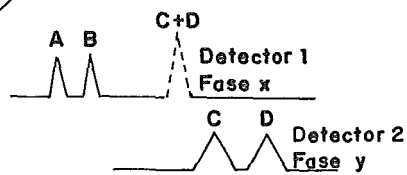
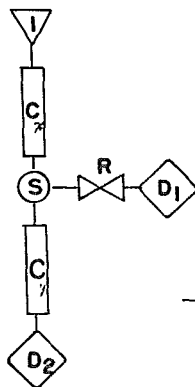
A



B



C



D

Figura 12

ARREGLOS BIDIMENSIONALES EN CROMATOGRAFIA DE GASES
(referencia 46)

A: Un inyector, una columna, dos detectores (uno específico y uno no específico).

B: Un inyector, dos columnas (fases X y Y), dos detectores. Determinación simultánea de índices de retención.

C: Dos instrumentos separados, cada uno con: un inyector, una columna, un detector. Resolución de un solo compuesto de una mezcla parcialmente resuelta.

D: UN inyector, dos columnas, un restrictor, un interruptor (s), dos detectores. Resolución de componentes en trazas; eliminación de compuestos interferentes.

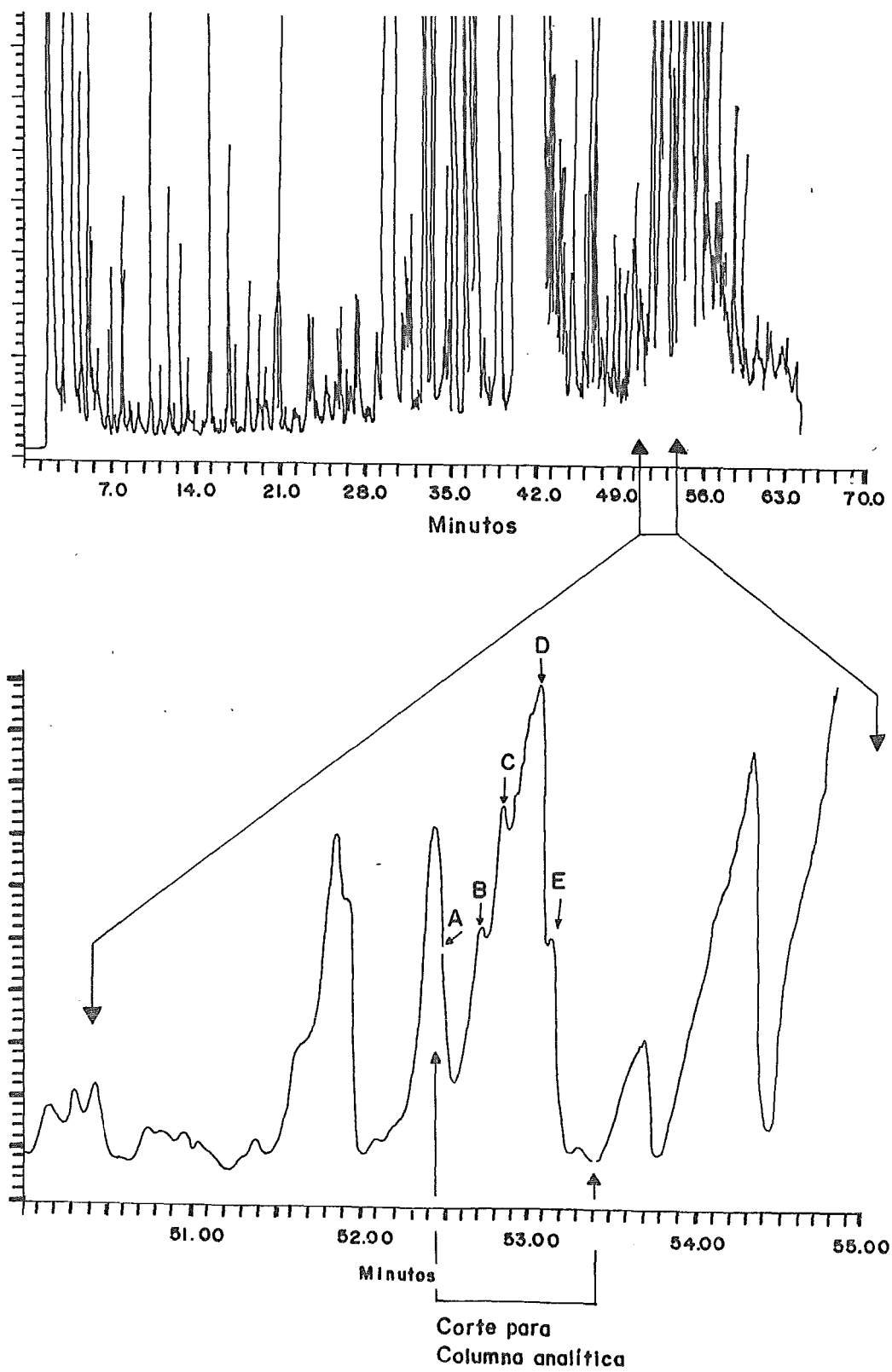


Figura 13

Cromatograma generado por una muestra de humo de tabaco (referencia 33)

vuelve a desarrollar en una columna analítica, obteniéndose el cromatograma de la figura 14. Ahora se observan 9 picos perfectamente resueltos. El primer pico por integración, constituye el 60% del área total del cromatograma, el otro 40% es distribuido entre los 8 componentes restantes.

Este estudio no solo demuestra la alta capacidad de resolución de la CGBD, sino también, la dramática disminución del tiempo de preparación de muestra para el análisis de componentes minoritarios en muestras complejas. El tiempo de análisis también ha sido reducido en la precolumna. Además, el método es genérico, esto quiere decir que cualquier componente que eluya de ambas columnas, puede ser analizado siguiendo esta metodología.

No obstante las ventajas que ofrece la CGBD, su empleo está poco extendido (34).

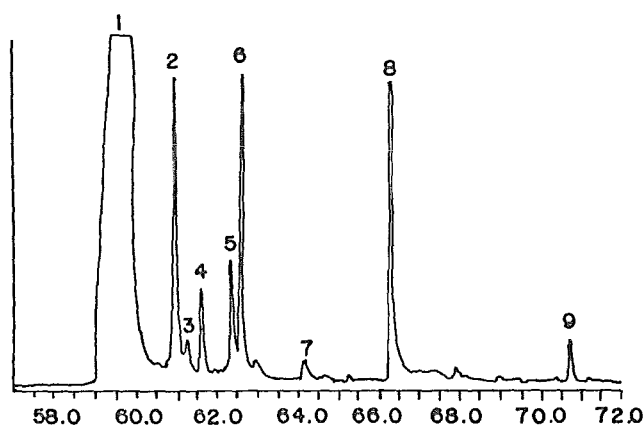


Figura 14

Cromatograma generado del "heart cutting" (indicado en la figura 13) de una muestra de humo de tabaco, (referencia 33)

2.4 ANALISIS DE LOS COMPUESTOS VOLATILES DEL CAFE.

2.4.1 Composición química del café.

El café ha sido consumido por el hombre por muchos siglos (se introdujo en América en el año 1668), y se ha constituido gradualmente en uno de los productos más importantes del comercio internacional (millones de sacos anuales).

Se han separado e identificado más de 800 componentes en el café (35). Estos incluyen 227 compuestos alifáticos, 20 alicíclicos, 91 aromáticos y 330 heterocíclicos; 7 gases, 40 elementos inorgánicos e iones, 128 enzimas, lípidos, alcaloides y vitaminas. La información sobre los constituyentes volátiles del café ha aumentado en gran medida durante la última década. La identidad de los constituyentes del aroma en el café se ha estudiado por numeros investigadores (36), (37), (38).

El café tiene una composición química compleja y variable. Se da a continuación una ilustración aproximada de la composición química del café verde y tostado.

2.4.1.1. Composición del café verde.

La denominación de "café verde" se reserva a los granos sanos y enteros, desprovistos de su pergamino (39). La tabla I da la composición aproximada del café verde. La tabla muestra los compuestos solubles e insolubles en agua. Los carbohidratos representan la mayor porción del grano del café verde. Las cenizas están constituidas en su mayor parte por potasio, sodio, calcio, magnesio, fósforo y azufre. El café verde contiene de

2.4 ANALISIS DE LOS COMPUESTOS VOLATILES DEL CAFE.

2.4.1 Composición química del café.

El café ha sido consumido por el hombre por muchos siglos (se introdujo en América en el año 1658). y se ha constituido gradualmente en uno de los productos más importantes del comercio internacional (millones de sacos anuales).

Se han separado e identificado más de 800 componentes en el café (35). Estos incluyen 227 compuestos alifáticos, 20 alicíclicos, 91 aromáticos y 330 heterocíclicos; 7 gases, 40 elementos inorgánicos e iones, 128 enzimas, lípidos, alcaloides y vitaminas. La información sobre los constituyentes volátiles del café ha aumentado en gran medida durante la última década. La identidad de los constituyentes del aroma en el café se ha estudiado por numeros investigadores (36), (37), (38).

El café tiene una composición química compleja y variable. Se da a continuación una ilustración aproximada de la composición química del café verde y tostado.

2.4.1.1. Composición del café verde.

La denominación de "café verde" se reserva a los granos sanos y enteros, desprovistos de su pergamino (39). La tabla I da la composición aproximada del café verde. La tabla muestra los compuestos solubles e insolubles en agua. Los carbohidratos representan la mayor porción del grano del café verde. Las cenizas están constituidas en su mayor parte por potasio, sodio, calcio, magnesio, fósforo y azufre. El café verde contiene de

1 al 3% de nitrógeno total, el cual se encuentra formando parte de diversas combinaciones, las principales son los prótidos y los alcaloides. Algunos aminoácidos azufrados (cistina, metionina) presentes en los prótidos del café, juegan un papel importante en

TABLA I. Composición química del café verde (referencia 40)

Componentes	Solubilidad en agua	Porcentaje
Carbohidratos	Solubles	60
Aceites	Insolubles	13
Proteínas	Dependiente de % desnaturalizado	13
Cenizas (óxidos)	Dependiente del % hidrolizado	4
Acidos no volátiles	solubles	8
Trigonelina	soluble	1
Cafeína	soluble	1

Tabla II. Composición química del café tostado (referencia 40)

Componentes	Solubles	Insolubles %
Carbohidratos	11.9	43
Aceites	-	15
Proteínas	2	11
Cenizas (óxidos)	3	1
Acidos no volátiles	6.5	-
Acidos volátiles	0.35	-
Trigonelina	1.0	-
Cafeína	1.2	-
Fenólicos	2.0	-
Volátiles		
- Dióxido de carbono	Trazas	2.0
- Esencia de aroma y sabor	0.04	-
Total	27.99	72

la formación del aroma. Los principales alcaloides del café son la cafeína y la trigonelina. Las grasas del café son ricas en sustancias insaponificables. Los principios volátiles contenidos en el café verde están representados por el agua y una pequeña cantidad de aceite esencial.

2.4.1.2 Composición del café tostado.

Una comparación de los análisis de café verde y café tostado, muestra lo que sucede con los compuestos químicos, tabla II. Algunos de los carbohidratos son destruidos en el proceso de tostado. Casi toda la sacarosa desaparece. Los carbohidratos son caramelizados, proporcionando el color característico del producto torrefactado.

2.4.2 Composición e identificación de los compuestos volátiles del café.

La naturaleza química del aroma del café es bastante compleja. Hay numerosos volátiles; unos muy volátiles, otros sujetos a oxidación rápida o sujetos a polimerización. Además, otros pueden resinificarse y precipitarse (40).

Los datos obtenidos de investigaciones usando cromatografía de gases y absorción infraroja y/o espectrometría de masas, muestran que alrededor del 50% de los volátiles son aldehídos, alrededor del 20% son cetonas, el 8% ésteres, cerca del 7% heterocíclicos, un 2% sulfuro de dimetilo y en menores cantidades nitrilos, alcoholes e hidrocarburos saturados de bajo peso molecular y algunos insaturados como isopreno. También se

encuentran furanos, furfurales, ácido acético y homólogos.

La tabla III ilustra algunos de los compuestos químicos en el aroma de los granos de café tostado. La tabla IV muestra los porcentajes de algunos componentes volátiles identificados, y señala su importancia relativa en el aroma.

Las primeras investigaciones sobre la naturaleza del aroma del café fueron llevadas a cabo por métodos clásicos. Estos resultan inadecuados para resolver los problemas del aroma, y no serán discutidos aquí.

La mayoría de las investigaciones recientes utilizan la cromatografía de gases como una técnica de separación acoplada a espectrometría de masas para la identificación de los compuestos aislados.

2.4.3 Formación del aroma del café.

Su sabor distintivo es la razón principal para la alta aceptabilidad de que goza en todo el mundo, la bebida preparada de los granos de café tostado; en particular el aroma del café parece de por sí, ser muy atractivo para mucha gente.

El problema de establecer la naturaleza de este aroma ha intrigado a los químicos por largo tiempo, pero sus esfuerzos generalmente han sido frustrados por la complejidad del problema. Eminentes científicos se han dedicado a este estudio; entre ellos Reichstein y Staudinger (1926,1955); las herramientas disponibles por Reichstein y Studinger para trabajar sobre el problema del café, parecen casi primitivas, si se comparan con las disponibles en esta época; sin embargo, ellos fueron los

Tabla III. Constituyentes volátiles de los granos tostados de café (referencia 40).

Constituyentes	Porcentaje
Aldehídos	40
Cetonas	38
Compuestos heterocíclicos	6
Compuestos azufrados	2.5
Esteres	5
Nitrilos	1.2
Alcoholes	1
Hidrocarburos	4
Oxidos	2.3

Estos porcentajes pueden variar, dependiendo del tipo de café, grado de tostado, método de tostado, etc.

Tabla IV. Análisis del aroma del café (referencia 42)

Compuesto	Porcentaje	Importancia relativa ^a
Acetaldehído	19.9	1
Acetona	18.7	2
Diacetil	7.5	1
n-Valeraldehído	7.3	2
2-metil butiraldehído	6.8	2
3-Metil butiraldehído	5.0	2
Metil furano	4.7	2
Propion aldehído	4.5	2
Metil formato	4.0	2
Dióxido de Carbono	3.8	-
Furano	3.2	1
Isobutiraldehído	3.0	1
Pentadieno (isopreno)	3.0	2
Metil etilcetona	2.3	2
Parafinas y olefinas C ₄ -C ₇	2.0	2
Metil acetato	1.7	2
Dimetil sulfuro	1.0	1
n-butiraldehído	0.7	1
Etil formato	0.3	2
Disulfuro de carbono	0.2	2
Alcohol metílico	0.2	3
Metil mercaptano	0.1	1

a: 1 grande, 2 media, 3 pequeña.

pioneros en la química del aroma y del sabor. Les siguieron otros investigadores Prescott y colaboradores, 1937; Johnson y Frey, 1938; Hughes y Smith, 1949; quienes también encontraron múltiples dificultades. Fue hasta el desarrollo de la cromatografía de gases y de los métodos espectrales de elucidación estructural que el viejo problema se atacó con nuevas perspectivas.

El sabor del café verde no es muy apetecido, el sabor y aroma deseables se desarrollan solo durante el tostado, proceso que puede considerarse como una pirólisis moderada de los constituyentes del grano. La temperatura final varía entre 200 y 230°C dependiendo del mezclado o variedad (41).

La formación gradual de sustancias volátiles a medida que progresa el tostado, se ilustra en la figura 15. Los ejemplos ilustrados en la figura 16 muestran que algunos compuestos alcanzan sus picos durante el intervalo de tiempo correspondiente a un tostado comercial, mientras otros lo hacen fuera de este intervalo. Es notable el hecho de que mientras muchos de los constituyentes volátiles disminuyen cuando el tostado se continúa más allá de los límites usuales, las velocidades de formación de unos pocos compuestos exceden sus velocidades de eliminación en el área de sobre-tostado. El hecho de que la concentración de algunos volátiles después de una disminución inicial aumenta de nuevo, puede entenderse considerando que una sustancia volátil dada, puede derivarse de dos o más precursores de diferente estabilidad térmica. De otra parte, es posible para un precursor dado, dar origen a una cierta sustancia volátil por dos o más vías de diferentes requerimientos energéticos.

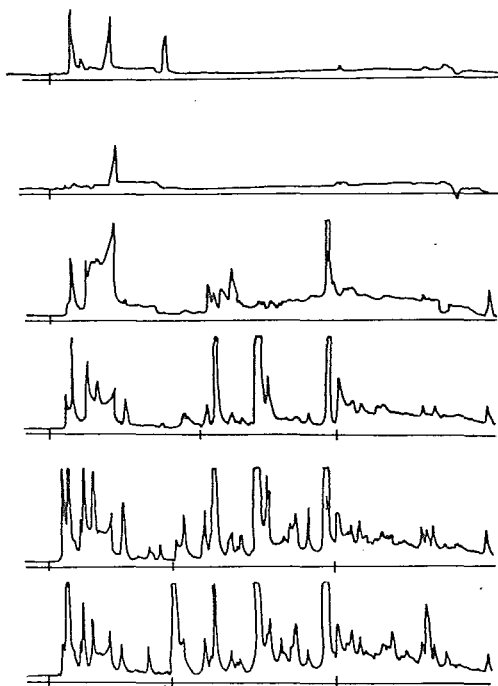


Figura 15

Formación de constituyentes volátiles durante el tostado del café. (referencia 41)

De arriba a abajo: café verde, 2, 6, 8, 11 y 15 minutos de tostado.

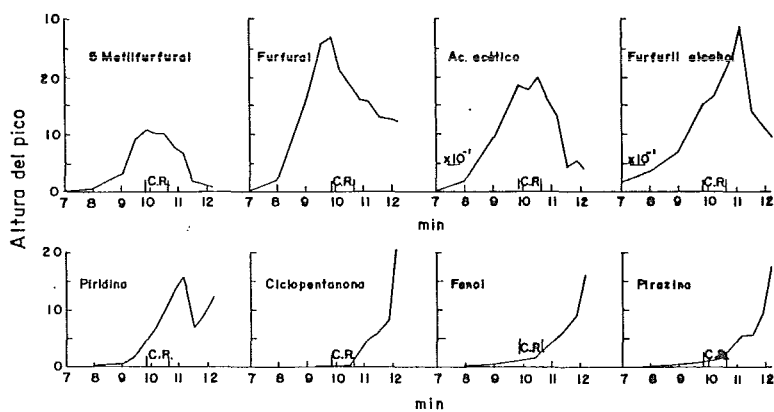


Figura 16

Variación en las cantidades de algunos constituyentes volátiles del café durante el tostado. (referencia 41)

Entre los componentes volátiles del café tostado no existe un compuesto principal que juegue un mayor papel en el aroma del café (36). La teoría desarrollada recientemente indica que los compuestos orgánicos de azufre, en especial los de puntos de ebullición más bajos, son los principales contribuyentes al olor y al sabor de muchos alimentos (35). Un detector selectivo como el detector fotométrico de llama (DFLL) puede facilitar el análisis de tales compuestos en combinación con la evaluación sensorial.

Los compuestos de azufre ocurren en café tostado en muy bajas concentraciones (42). Sin embargo, estos compuestos son muy volátiles y tienen potentes olores. Los constituyentes volátiles azufrados del aroma del café juegan la mayor parte en la caracterización del agradable aroma y sabor de esta bebida.

Un examen de las fórmulas de las sustancias que forman el aroma del café revelan que la descomposición pirolítica de carbohidratos en moléculas de 2 a 5 unidades de carbono, con eventual recombinación de los fragmentos, es responsable de la formación de varios constituyentes del aroma del café. Los compuestos furánicos, las dicetonas cíclicas y el maltol son también originados de carbohidratos (41).

El tostado de las proteínas del grano de café conduce a varios productos de bajo peso molecular, aminoácidos, amoníaco, aminas, sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano, sulfuro de dimetilo, etc., algunos de los cuales aparecen en el aroma del café o reaccionan con carbohidratos y sus productos de degradación (41).

Puede decirse que las diferencias en el aroma y sabor del

café son el resultado de:

- el tipo de café verde usado y
- las condiciones de procesamiento empleadas.

Si la materia prima es pobre, no se puede esperar un buen producto final. De otra parte, una buena materia no asegura un buen producto final.

Además de la forma y grado de tostado, hay otros factores que influyen en el aroma del café: origen geográfico, método de cultivo, almacenaje, mezclado antes o después del tostado, grado de molienda, empaquetamiento, agua usada en la preparación, modo de preparación de la bebida, aceptación subjetiva del consumidor.

2.4.4 Investigaciones recientes.

2.4.4.1 T.H. Wang, H. Shanfield y A. Zlatkis (35) desarrollaron y estandarizaron un método experimental para el análisis de trazas de compuestos orgánicos volátiles. El método fue estandarizado para las necesidades generales de las áreas relacionadas con la investigación del aroma.

Wang y colaboradores analizaron los compuestos volátiles del café y usaron en su estudio:

- el método de purga y trampa para coleccionar y concentrar los compuestos volátiles.
- evaluación sensorial para separar las fracciones responsables del aroma del café.
- el proceso de "división de muestra" les permitió separar y coleccionar las diferentes fracciones sobre trampas Tenax.
- sistemas acoplados cromatografía de gases-espectrometría de

masas, para la separación final y la identificación de los compuestos.

El sistema de purga y trampa que usaron se esquematiza en la figura 17. La muestra consistió en 4 g de café molido; el gas de purga fue He y el adsorbente una trampa Tenax sumergida en nitrógeno líquido. La muestra fue purgada por 30 min, después la trampa fue desconectada y selladas sus dos terminales. Las trampas fueron analizadas inmediatamente o guardadas en el refrigerador para análisis posteriores.

El método de purga y trampa se basa en la adsorción selectiva de los compuestos volátiles sobre diferentes tipos de materiales, en este caso: Tenax (43), (44). Los compuestos volátiles son removidos con un gas inerte (He) y retenidos sobre el adsorbente (Tenax). A continuación los compuestos de interés son desorbidos térmicamente y transferidos a la columna cromatográfica para su separación.

La figura 18 muestra el sistema de división de muestra "heart cutting" y el dispositivo para la evaluación sensorial que fueron utilizados en la determinación de las fracciones de volátiles. La columna 2 fue una columna empacada de Carbowax 1500. La precolumna 1 se usó para introducir la muestra en la columna 2. El eluyente se dividió a la salida de la columna 2, en la relación 1:1, hacia los dos detectores (DILL y DFLL). A continuación se desprendieron dos líneas: una que fue al dispositivo para la evaluación sensorial y la otra a un "switch" el cual controló el flujo hacia una de dos trampas Tenax. Cuando se notó el aroma del café, la trampa se sumergió en nitrógeno líquido y los compuestos de interés fueron colectados; este

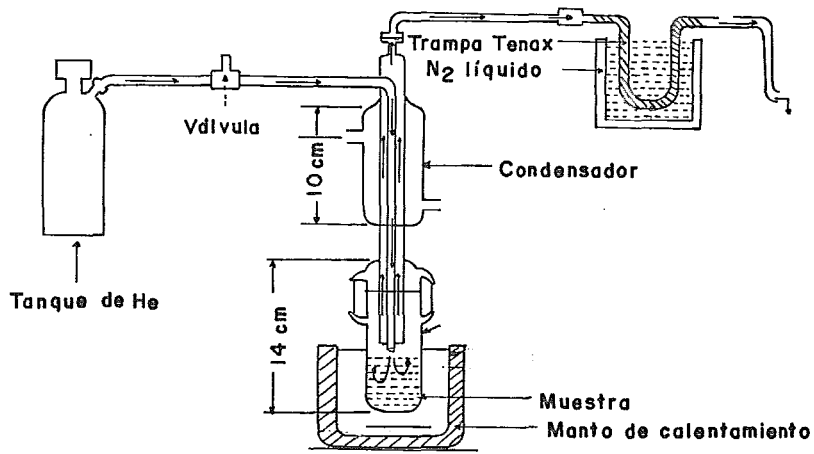


Figura 17
 Equipo para la técnica de purga y trampa.
 (referencia 35)

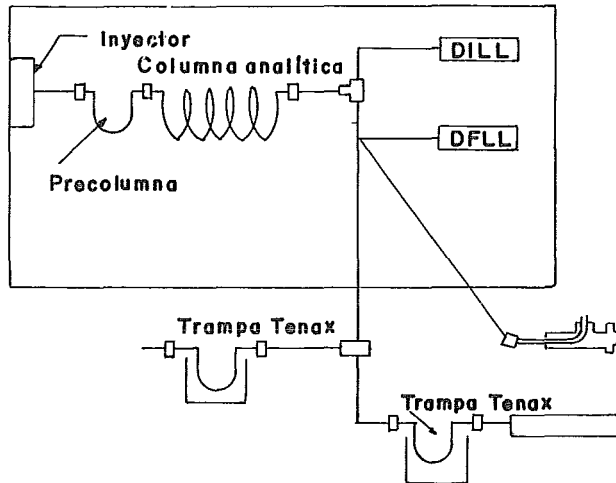


Figura 18
 Sistema de "heart cutting" y evaluación sensorial.
 (referencia 35)

Tabla V. Compuestos volátiles en cada fracción del café
(referencia 35).

Fracción	Compuesto
I	2-metil furano acetano de etilo 1.1-dicloro-1-nitroetano benceno 2-metil butanol
II	diacetil acetato de etilo pentanal disulfuro de dimetilo
III	diacetil 2,5-dimetil furano 2-metil-3-pentanona pirazina 2,4-dimetil-3-pentanona γ -valerolactona
IV	acetona hexano 1,1,1-tricloroetano 2-vinil crotonaldehído fenol 3 hexanona 2-(metoximetil)-furano
V	cloruro de metileno 2-metoxi-2-metil propano acetato de etilo 1,1,1-tricloro etano ciclohexano benceno 2.3-pentanodiona

procedimiento se repitió para diferentes fracciones del aroma. Cuando cada una de las fracciones se completó se sellaron las trampas, las cuales se guardaron en un refrigerador para posterior identificación. El contenido de cada trampa Tenax fue desorbido y transferido al sistema conjugado cromatografía de gases/espectrometría de masas para la identificación de los compuestos: la columna capilar de sílica fundida fue DB-5 (Machereg-Megel) (95% metil, 5% fenil silicón), equivalente a SE-54. Los resultados obtenidos por los investigadores revelan cinco regiones del aroma indicadas como fracciones I, II, III, IV, V; las fracciones III y IV se catalogaron como regiones mayoritarias del aroma y las I, II, V, como minoritarias.

Los compuestos identificados en las fracciones individuales se muestran en la Tabla V.

2.4.4.2 K. Harada, O. Nishimura y S. Mihara (38), efectuaron un análisis rápido del aroma del café usando un pirolizador.

Los compuestos volátiles fueron removidos de una muestra de 10 mg de café molido por calentamiento a 235°C en un soporte ferromagnético. El tiempo total de calentamiento fue de 3 seg. Los autores indican que el pirolizador puede conectarse con facilidad al inyector del cromatógrafo de gases.

Los resultados de este estudio se muestran en la figura 19. Cuando el pirolizador se usó a diferentes temperaturas de calentamiento (intervalo de 170 a 235°C) la composición cualitativa de los compuestos volátiles del café molido, no

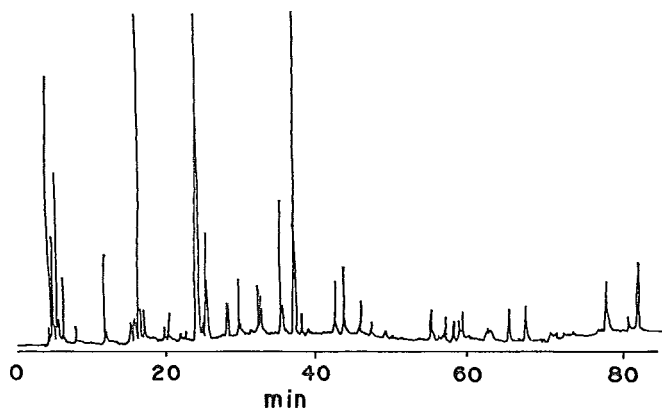


Figura 19

Cromatograma de los compuestos volátiles del café empleando un pirolizador acoplado al cromatógrafo de gases.
(referencia 38)

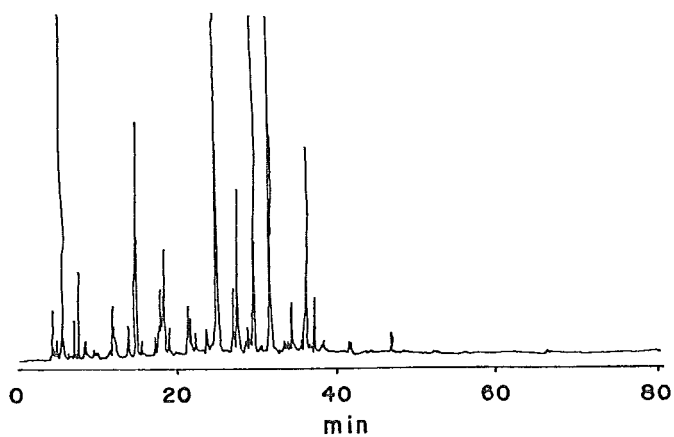


Figura 20

Cromatograma de los compuestos volátiles del café empleando la técnica de purga y trampa.
(referencia 38)

cambió. Los compuestos fueron identificados por EM. Los investigadores compararon los resultados obtenidos por este método con los obtenidos por el método convencional de purga y trampa consignados en la figura 20.

Concluyen los autores que el método usando el pirolizador ofrece una manera simple y eficiente para aislar el aroma de pequeñas cantidades de café molido.

3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

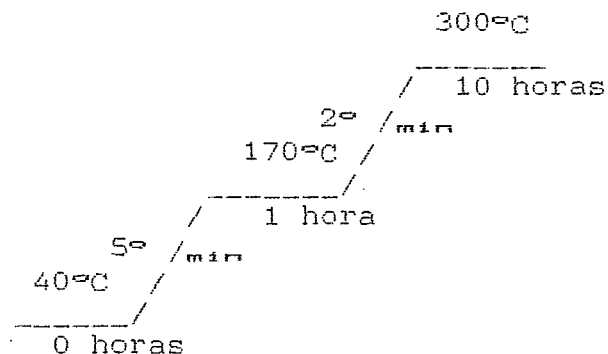
- Cromatógrafo de gases con detectores de ionización de llama, marca Varian aerograph, modelo 2100.
- Cromatógrafo de gases, marca Varian aerograph, modelo 1400.
- Integrador digital, marca Hewlett Packard, modelo 3390A.
- Jeringa con válvula de seguridad para gases de 250 μ l.
- Columna 1: Capilar SE-54, L=25 m y D.I. = 0.25 mm.

Se preparó de la siguiente manera (45):

- Al tubo de sílica fundida se le pasó HNO_3 al 20% con flujo de nitrógeno.
- Calentamiento a 200°C por 12 horas (hidrólisis).
- Lavado con HNO_3 al 1% con flujo de nitrógeno.
- Lavado con metanol con flujo de nitrógeno.
- Deshidratación a 225°C por 90 min. con flujo de nitrógeno seco.
- Silanización estática con D_4 (octametil-ciclotetra-siloxano).
- Calentamiento a 400°C por 90 min.
- Lavado con cloruro de metileno
- Calentamiento por 30 min con flujo de nitrógeno.
- Recubrimiento estático con la fase SE-54 (metil fenil

vinil silicón), previamente preparada.

- Evaporación del disolvente CH_2Cl_2 . El tiempo de evaporación fue de 21 h.
- Entrecruzamiento estático con el siguiente programa de temperatura.



- Evaluación de la columna
- Columna 2: Capilar Carbowax 20 M, L = 25 m, D.I. = 0.25 mm
Se preparó de la siguiente manera (45):
Se siguieron los mismos pasos que para la preparación de la columna 1 hasta la deshidratación a 225°C por 90 min.
Después se recubrió la columna con carbowax 20 M empleando como disolvente cloruro de metileno. A continuación se evaporó el disolvente por un periodo de 21 horas usando vacío. La columna fue evaluada antes de trabajar con ella.
- Balanza analítica marca Mettler, modelo H54AR.
- Parrilla de calentamiento.
- Frascos viales con válvula de seguridad para gases (Mininert), capacidad 15 ml (Alltech).
- Llave mecánica manual de 6 pasos.
- Reguladores de presión.
- Válvulas de aguja.

- Conexiones T capilar de vidrio
- Restrictores capilares.
- Tuercas, tuberías y conversiones de bronce para conexiones
- Helio, nitrógeno, hidrógeno y aire de alta pureza (Infra)
- Café del estado mexicano de Chiapas: mezcla de planchuela y caracolillo (Expendio "Aroma" de la ciudad de México).
- Café Internacional de Córdoba (Cafiex, S.A. de México).
- Café de Colombia: Sello Dorado (Industria Colombiana de Café, S.A.)
- Nescafé Ristreto (Compañía Nestlé, S.A. de México).
- Estándares de:
 - Acetaldehído, etanol, metanol, acetato de metilo, acetona,
 - Butanona, 1-butanol, diacetil, formiato de metilo,
 - 1-propanol, piridina, ácido formico, furfural, fenol,
 - propanal, metil etilcetona, formiato de etilo, catecol,
 - acetato de etilo, naftaleno, tiofeno, acetato de metilo,
 - cloroformo, tolueno, benceno, hexano, cloruro de metileno,
 - ciclohexano, ácido acético, n-pentano.

3.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

Se realizó el montaje del sistema bidimensional de acuerdo con la figura 21 (46). Las adaptaciones se hicieron sobre el cromatógrafo modelo 2100. Del cromatógrafo modelo 1400 solo se usó el horno (Horno 2 de la figura 21).

La columna 1 fue la columna capilar SE-54 y la columna 2 fue la columna capilar Carbowax 20 M.

El regulador de presión 1, controla el flujo de He en la

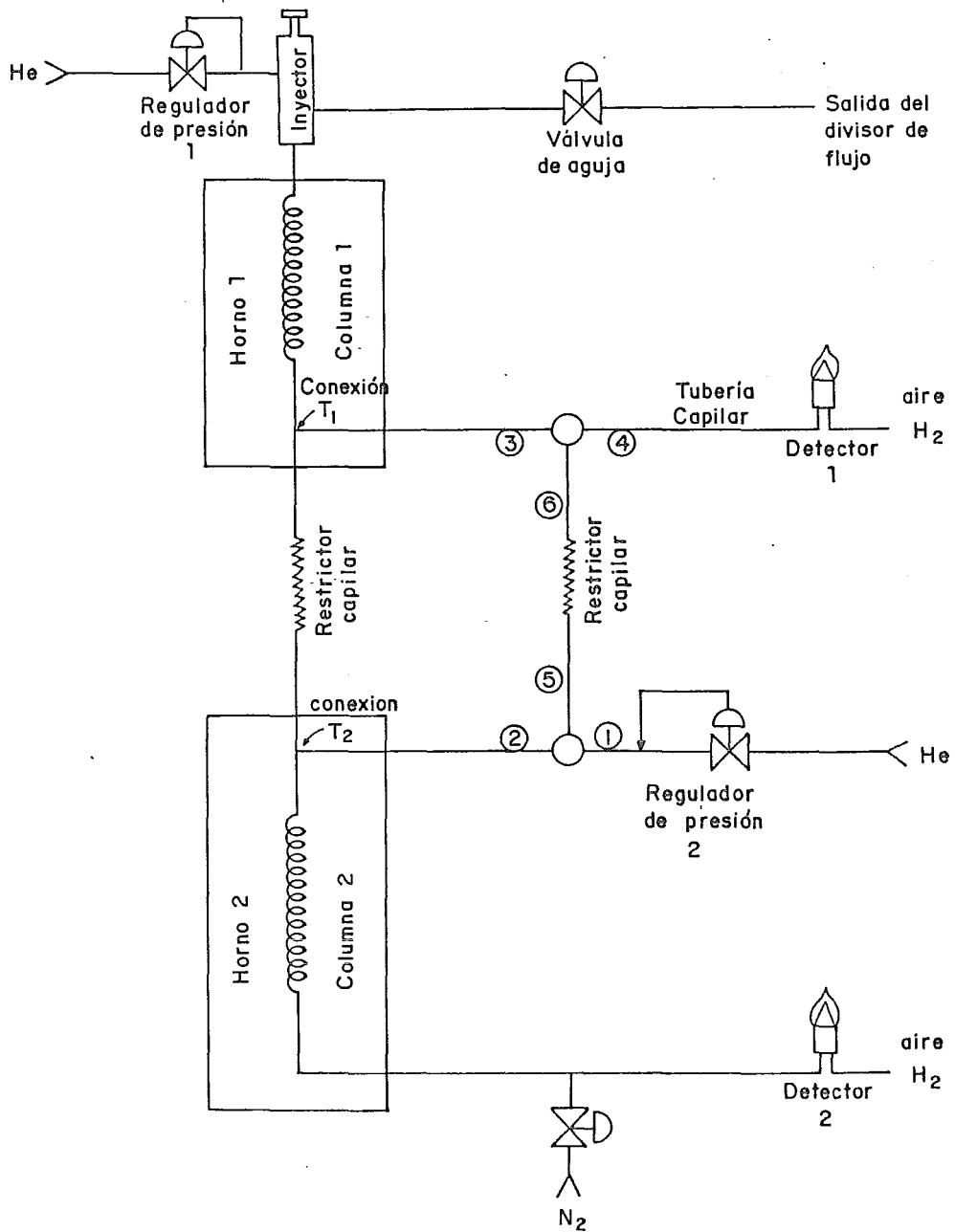


Figura 21

Esquema del sistema para Cromatografía de gases Bidimensional.

columna 1. El regulador de presión 2 controla el flujo de He en la columna 2.

①, ②, ③, ④, ⑤ y ⑥ son las entradas de la llave de seis pasos.

Se eligieron dos posiciones de la llave de seis pasos: la posición a y la posición b. La dirección del flujo en cada posición se muestra en las figuras 22 y 23. De estas figuras puede verse que:

$$F_{c1} = f(\Delta P_{c1}, P_0)$$

$$F_{r2} = f(P_1, \Delta P_{r2})$$

$$P_1 > P_0 - \Delta P_{c1}$$

$$P_0 - \Delta P_{c1} = P_1 - \Delta P_{r2}$$

$$F_{c2} = f(P_1, \Delta P_{c2})$$

$$F_{total} \propto (\Delta P_s, P_0)$$

y en la posición b, el flujo total a través de las dos columnas está determinado por:

$$F_b = f(P_0, \Delta P_{c1} + \Delta P_{r2} + \Delta P_{c2})$$

$$\Delta P_{r2} = \Delta P_{r3}$$

Estos flujos dependen de la longitud y el diametro de los restrictores y las columnas capilares; están determinados por la ecuación para flujo isotérmico compresible (47) de Weymouth:

$$F = 28 d^{2.667} \sqrt{\frac{P_e^2 - P_s^2}{Mg} \cdot \frac{520}{L} \cdot \frac{1}{T}}$$

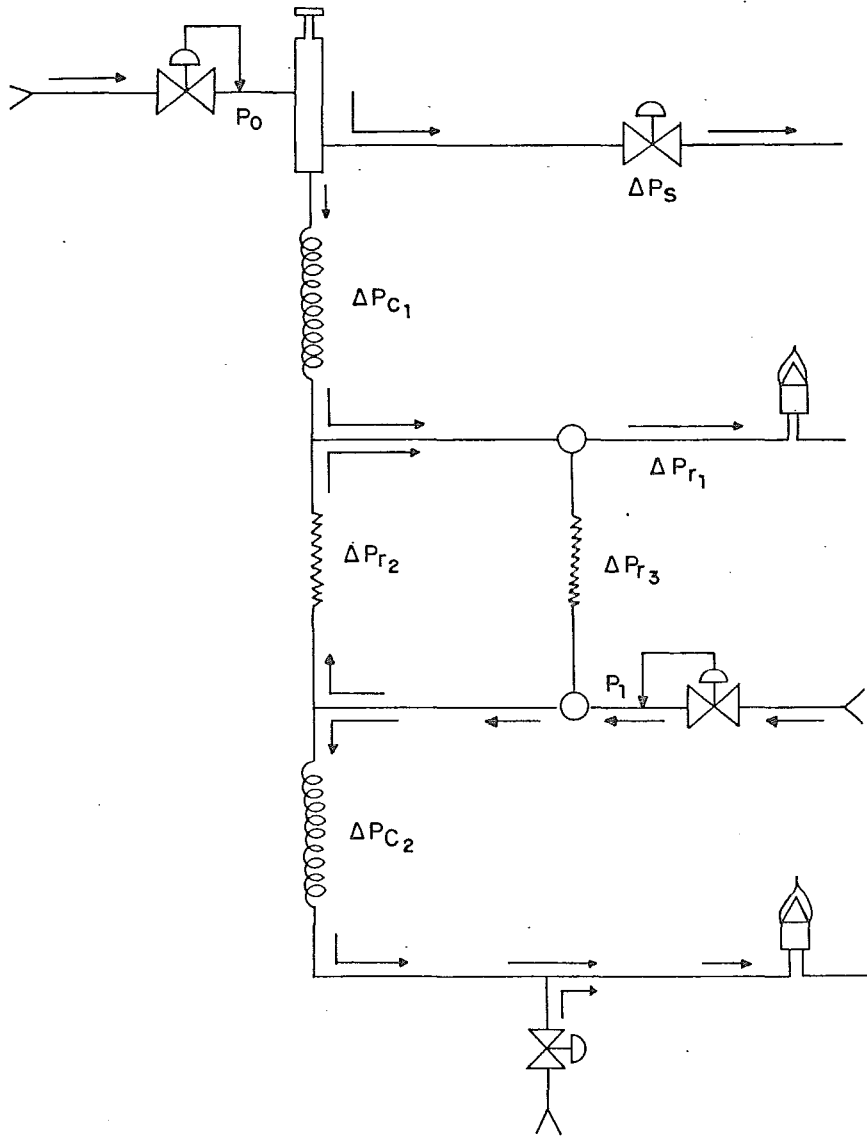


Figura 22

Dirección del flujo en la posición a de la llave de seis pasos.

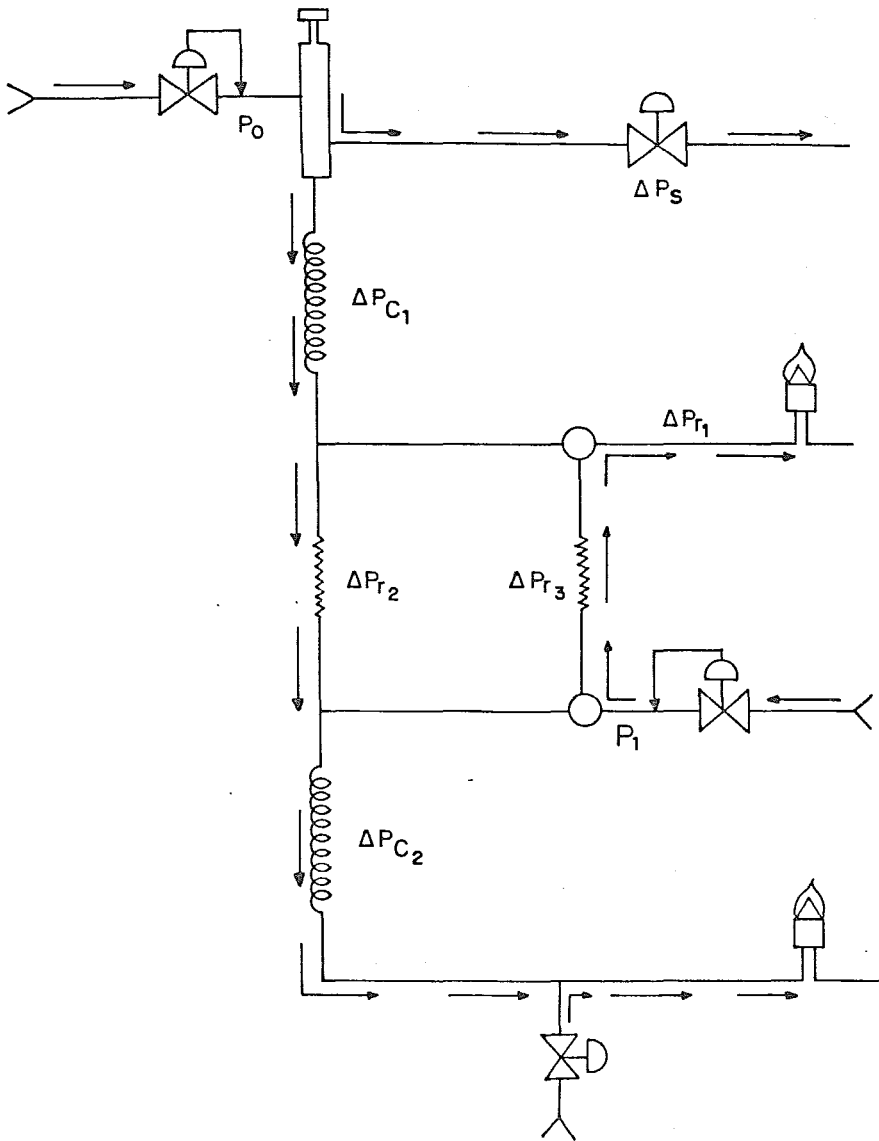


Figura 23

Dirección del flujo en la posición b de la llave de seis pasos.

F = flujo isotérmico
d = diámetro de la tubería
Pe = presión de entrada
Ps = presión de salida
PMg = peso molecular en gramos
L = longitud de la columna o restrictor
T = temperatura de trabajo

El funcionamiento de la llave de seis pasos se representa en la figura 24. La trayectoria del flujo en la llave se indica con áreas oscuras. En la posición a, la trayectoria del flujo es:

- 1) Inyector, columna 1, llave de seis pasos, detector 1.
- 2) He controlado por el regulador 2, llave de seis pasos, columna 2, detector 2.

En la posición b, la trayectoria del flujo es:

- 1) Inyector, columna 1, llave de seis pasos, columna 2, detector 2.
- 2) He del regulador 2, llave de seis pasos, restrictor capilar, llave de seis pasos, detector 1.

Los dos hornos tienen la capacidad de operar independientemente con temperatura isotérmica o programada.

Las T_1 y T_2 señaladas en la figura 21 se diseñaron de acuerdo a la figura 25. Las terminales de los capilares de vidrio fueron selladas con polimida.

Se determinó la longitud de los restrictores capilares para que el flujo fuera aproximadamente de 30 ml/min. Las medidas se hicieron a dos presiones diferentes. Los resultados se muestran en la tabla VI.

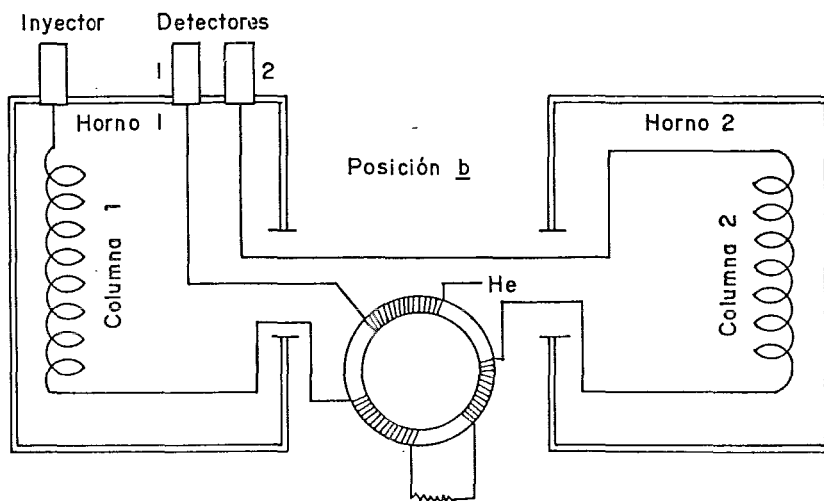
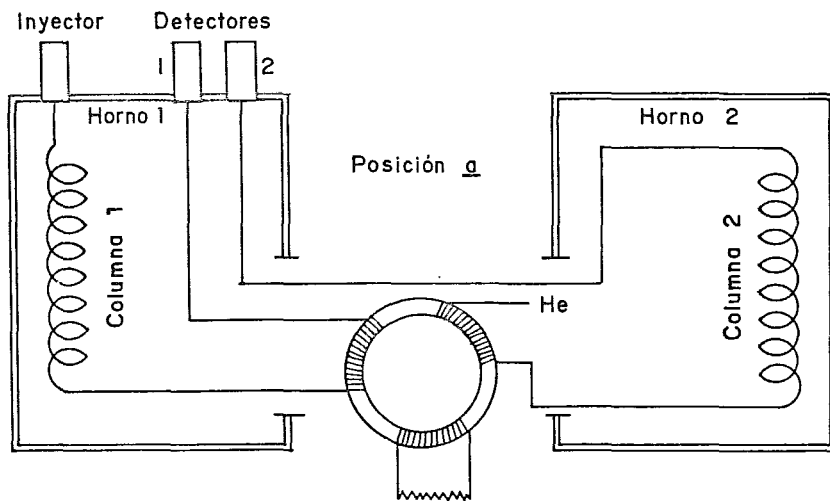


Figura 24

Llave de seis pasos que se uso en el proceso "heart-cutting".
La trayectoria del flujo en la llave se representa con áreas oscuras.

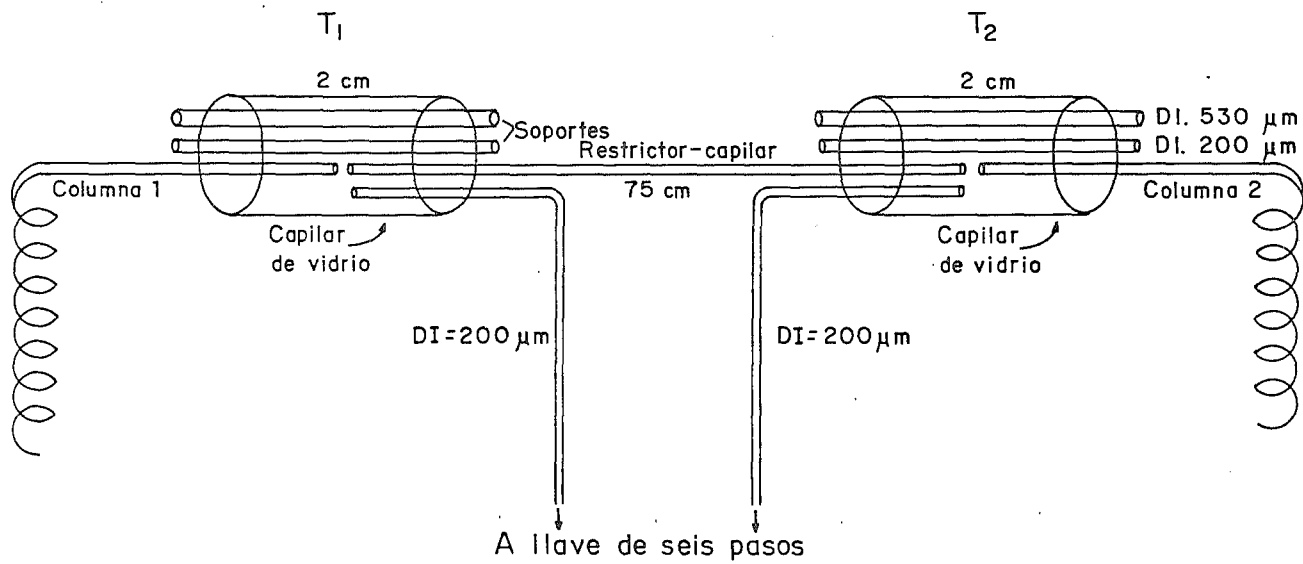


Figura 25

Esquema de las conexiones en "T" construidas para el sistema Bidimensional

Tabla VI. Relación entre la longitud de los restrictores capilares y el flujo.

P = 20 psig.		P = 30 psig	
L	F	L	F
2 m	10 ml/min	2 m	20 ml/min
1 m	20 ml/min	1 m	40 ml/min
0.75 m	30 ml/min	0.75 m	60 ml/min
0.5 m	40 ml/min	0.5 m	90 ml/min

El diámetro interno del capilar fue de 197.8 μm . De acuerdo a la tabla anterior, la longitud de los restrictores capilares debe ser de 0.75 m, para lograr el flujo deseado.

3.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO

3.3.1 Estudio de los factores que influyen en el análisis "Head space".

3.3.1.1 Resultados

Se analizó el efecto de las diversas variables de operación en el análisis del vapor confinado "Head space" para el café.

La sensibilidad fue medida como el área total de los picos cromatográficos.

El café estudiado fue el café de Chiapas (mezcla de planchuela y caracolillo).

En cada caso se pesó la misma cantidad de café. La muestra se colocó en viales de 15 ml. con válvulas de seguridad Mininert

y se calentó en un baño de agua a temperatura controlada. La muestra de vapor para el análisis se tomó con una jeringa de 0.25 ml con válvula de seguridad. El volumen inyectado fue de 200 μ l y la jeringa fue calentada antes de cada inyección para evitar condensación de la muestra.

Se estudiaron los siguientes factores que afectan la sensibilidad del análisis "Head space" para el café: temperatura de calentamiento, tiempo de equilibrio, relación fase vapor/sólido, presión inicial, grado de molienda, grado de tostado.

Se usó en estas pruebas una columna capilar SE-54 de L= 6 m y D.I. = 200 μ m. El detector fue de ionización de llama (DILL). La temperatura de la columna fue 130°C, se eligió esta temperatura después de correr un programa de temperatura para asegurarse de que se detectara la mayor cantidad de compuestos volátiles de la muestra. Las temperaturas del inyector y detector fueron 150°C.

El estudio del efecto de la temperatura de calentamiento sobre la sensibilidad del análisis "Head space", se muestra en la Tabla VII y la figura 26. La gráfica señala un incremento en la sensibilidad con el aumento de la temperatura, lográndose una estabilidad entre 80 y 90°C.

El estudio del efecto del tiempo de equilibrio sobre la sensibilidad del análisis, se muestra en la Tabla VIII y la figura 27. Se observa un aumento en la sensibilidad a medida que aumenta el tiempo de equilibrio, siendo este incremento muy marcado hasta los 15 min. a partir del cual tiende a estabilizarse.

Para establecer la mejor relación fase vapor/sólido, se

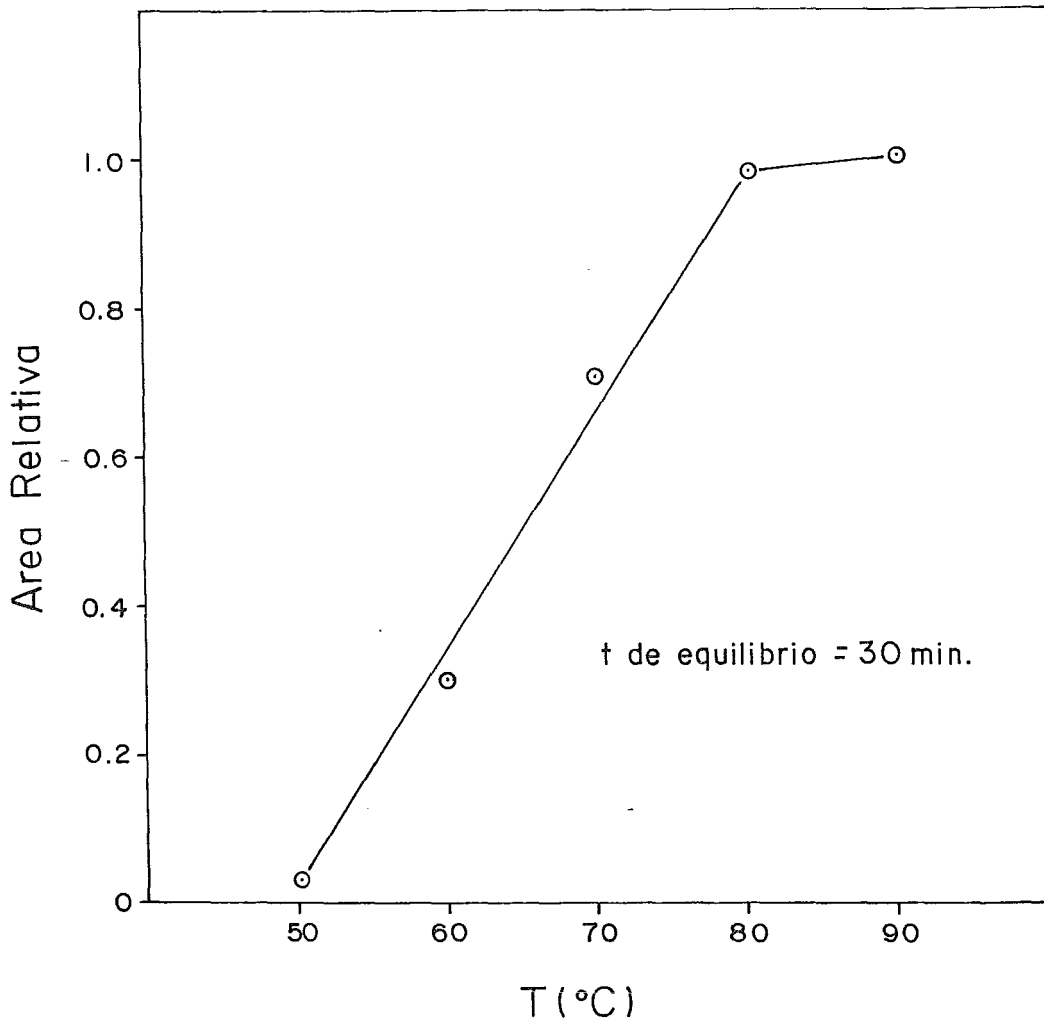


Figura 26. Efecto de la temperatura en la sensibilidad del análisis de vapor confinado "Head space"



Tabla VII
Efecto de la Temperatura

T (°C)	Area Relativa
50	0.031
60	0.307
70	0.713
80	0.989
90	1.0

Tabla VIII
Efecto del tiempo de equilibrio

t (min)	Area Relativa
5	0.448
10	0.703
15	0.943
20	0.946
30	0.965
40	0.992
50	0.981
60	1.0

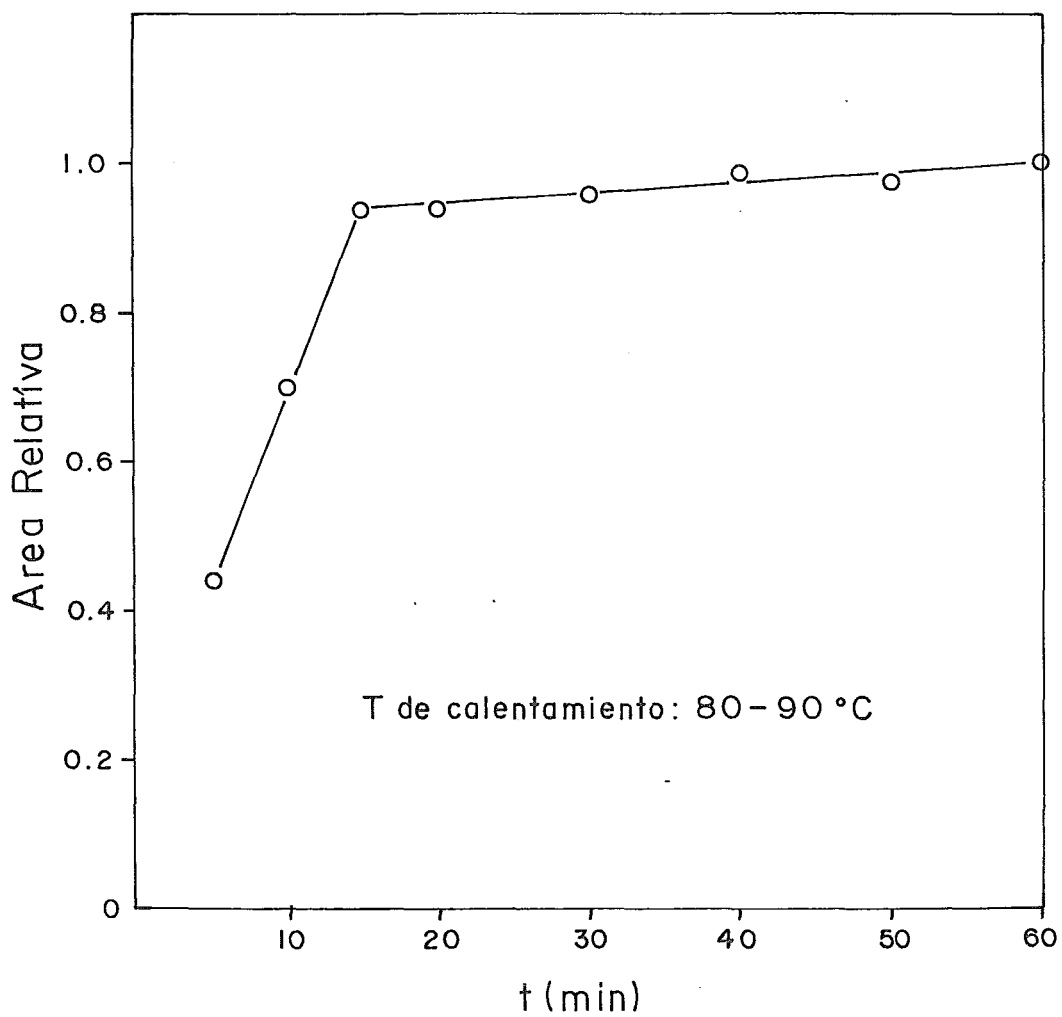


Figura 27. Efecto del tiempo de equilibrio en la sensibilidad del análisis de vapor confinado "Head space"

Tabla IX

Efecto de la relación fase vapor/sólido

Cantidad de muestra (g)	Area Relativa
0.2	0.245
0.5	0.423
0.75	0.602
1.0	0.702
1.2	0.863
1.5	1.0
1.6	0.985
1.7	0.907

Tabla X

Efecto de la presión inicial

t (min).	Area Relativa
0.0	0.780
2.0	0.862
3.0	0.946
5.0	1.0
7.0	0.959
8.0	0.890
10.0	0.857

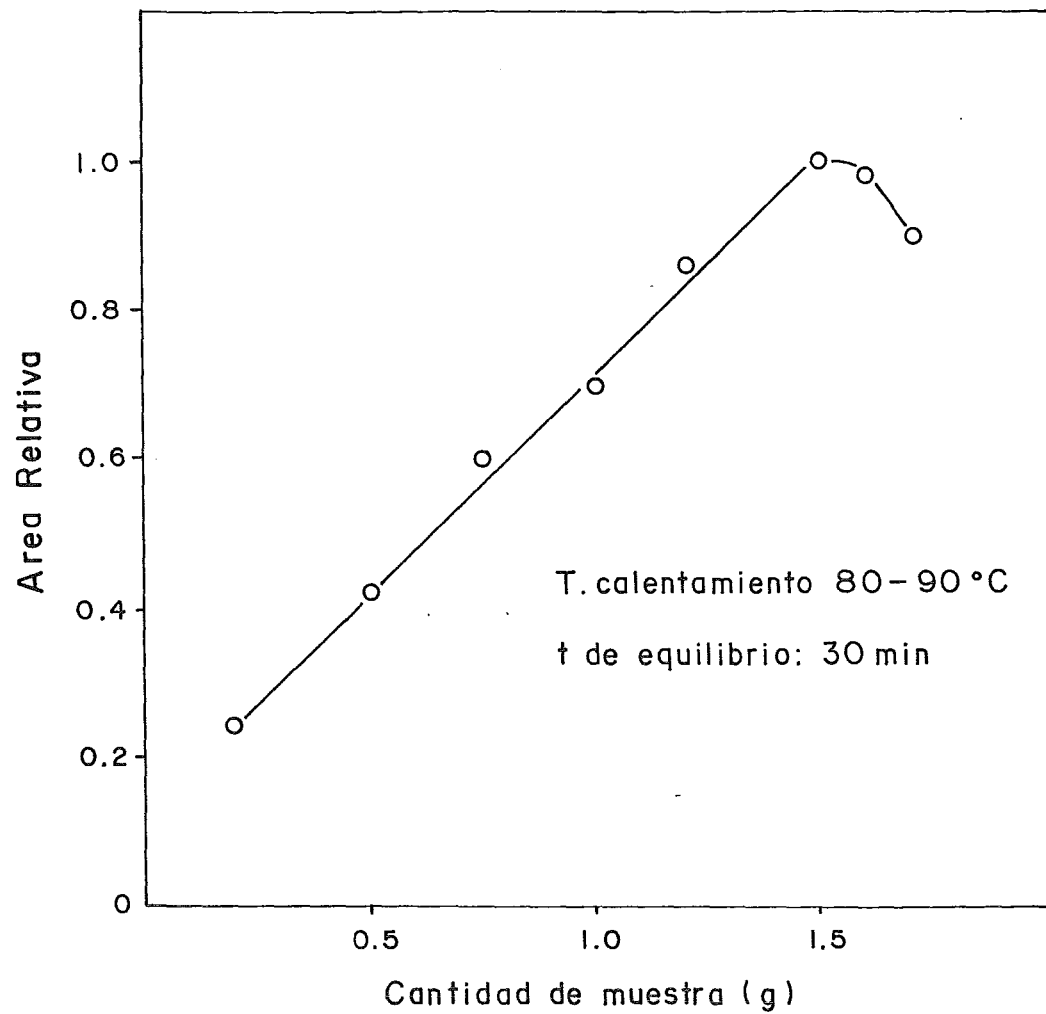


Figura 28. Efecto de la relación fase vapor/sólido en la sensibilidad del análisis de vapor confinado "Head space".

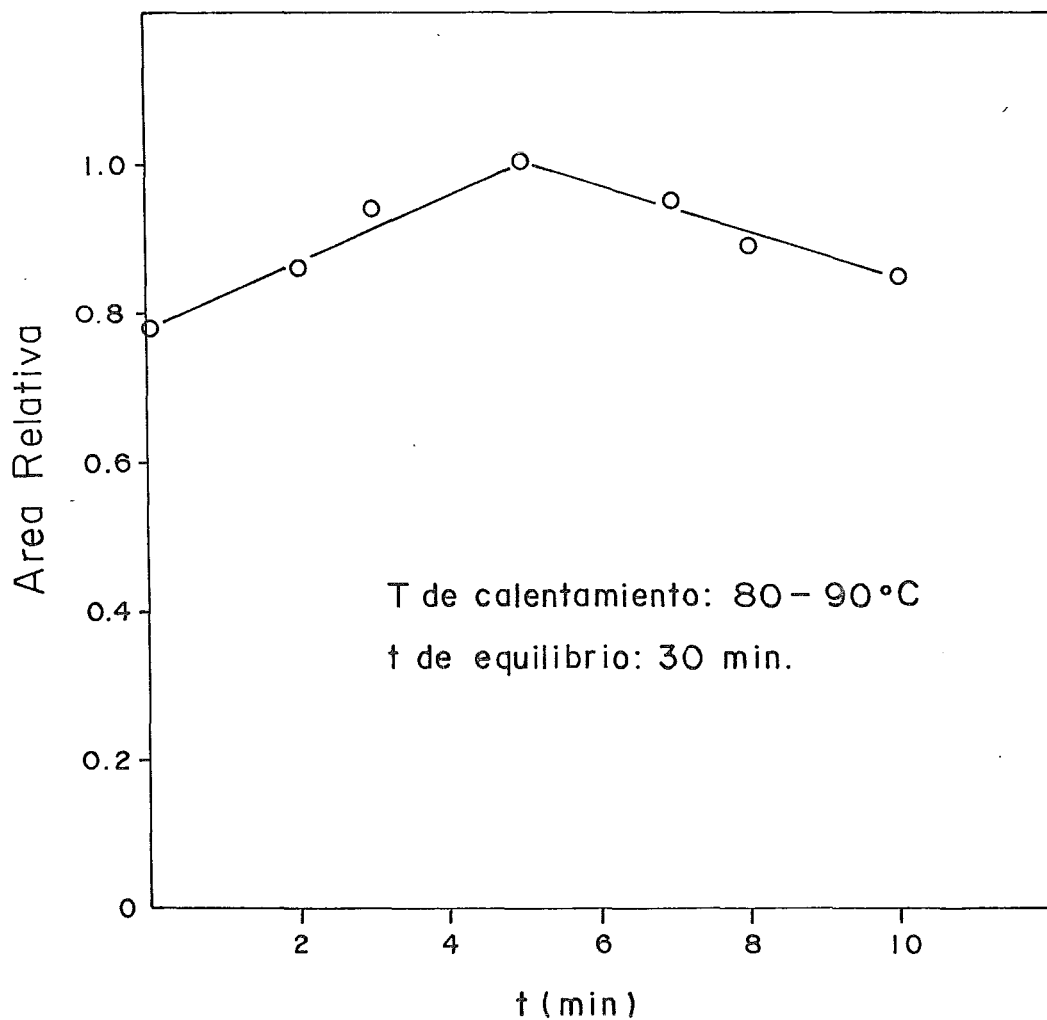


Figura 29. Efecto de la presión en la sensibilidad del análisis de vapor confinado "Head space"

pesaron diferentes cantidades de muestra: los resultados se presentan en la Tabla IX y figura 28. Puede notarse un aumento en la sensibilidad con el aumento en la cantidad de muestra hasta un cierto límite (1.5g); un aumento posterior en la cantidad de muestra produce una disminución en la sensibilidad del análisis.

Para el estudio del efecto de la presión se le aplicó a la muestra vacío antes de calentarla. La Tabla X y la figura 29 muestran el comportamiento observado. A medida que disminuye la presión inicial (aumento en el tiempo de vacío) aumenta la sensibilidad. Esto se observa hasta un tiempo de 5 min, a partir del cual disminuye la sensibilidad.

Los resultados encontrados al analizar el grado de molienda, se presentan en la Tabla XI, presentándose un incremento en la sensibilidad del método con la disminución del tamaño de la partícula de café, es decir con el aumento en el grado de molienda.

La Tabla XII muestra el efecto del grado de tostado, se observa que la sensibilidad del análisis se favorece cuando el café está bien tostado.

3.3.1.2 Discusión de los resultados y conclusiones.

Al aumentar la temperatura de calentamiento, mayor cantidad de compuestos volátiles del café pasan al estado de vapor. La estabilidad alcanzada entre 80 y 90°C puede indicar que la mayor parte de los compuestos volátiles se encuentran en la fase de vapor.

Tabla XI

Efecto del grado de molienda

grado de molienda	Area Relativa
Sin moler	0.637
medio	0.753
fino	1.0

Tabla XII

Efecto del grado de tostado

grado de tostado	Area Relativa
medio alto	1.0
medio	0.549

El tiempo de equilibrio para los compuestos volátiles del café se logra prácticamente a los 15 min, cuando la temperatura de calentamiento se mantiene entre 80 y 90°C. Puede considerarse que a partir de este tiempo (15 min) la cantidad de compuestos en la fase vapor permanece aproximadamente constante.

Al aumentar la cantidad de café existe mayor cantidad de compuestos volátiles que pueden pasar a la fase vapor; este comportamiento se observa hasta 1.5 g. Al seguir aumentando la cantidad de café, la relación fase vapor/sólido se hace tan pequeña, que el espacio disponible para la fase vapor puede ser insuficiente para contener a la mayor parte de compuestos volátiles.

La relación fase vapor/sólido fue de $1/3 V/V$.

Los resultados del estudio sobre el efecto de la presión inicial se explican teniendo en cuenta que al disminuir la presión sobre la muestra de café, más fácilmente pueden pasar a la fase vapor los compuestos volátiles, pues encuentran menor resistencia. Esto sucede hasta 5 min de vacío. Pero al aumentar el tiempo disminuye la cantidad de componentes en la fase vapor; esto puede deberse posiblemente a la pérdida de compuestos volátiles por efecto del vacío, algunos de los cuales pueden ser arrastrados en esta acción.

Respecto al grado de molienda puede entenderse que a menor tamaño de la partícula, los compuestos volátiles quedan en mayor libertad para pasar a la fase de vapor (40).

Al aumentar el grado de tostado del café aumenta la proporción de compuestos volátiles, ya que es durante la torrefacción cuando se forma a partir de precursores, la mayor parte de los

componentes del aroma del café (38), (39), (41).

De acuerdo al estudio realizado sobre la sensibilidad del análisis "Head space" a diferentes factores, se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo:

- Temperatura de calentamiento: 80-90°C
- Tiempo de equilibrio: ~ 30 min
- Cantidad de muestra: 1.5 g
- Grado de molienda: fino
- Grado de tostado: medio-alto

3.3.2 Temperaturas de operación de las columnas.

Se buscó la mejor separación de los compuestos volátiles del café empleando por separado cada una de las columnas. Se corrieron diferentes programas de temperatura, para los cuales, se consideraron los siguiente parámetros:

$T_{\text{inicial}} = f$ (primeros solutos)

$T_{\text{final}} = f$ (últimos solutos)

$t_{\text{inicial}} = f$ (primeros solutos y $T_{\text{mínima}}$ de operación)

$t_{\text{final}} = f$ (últimos solutos y T_{max} de la columna)

$T/\epsilon = f$ (complejidad de la muestra) --- (2-20)°C/min

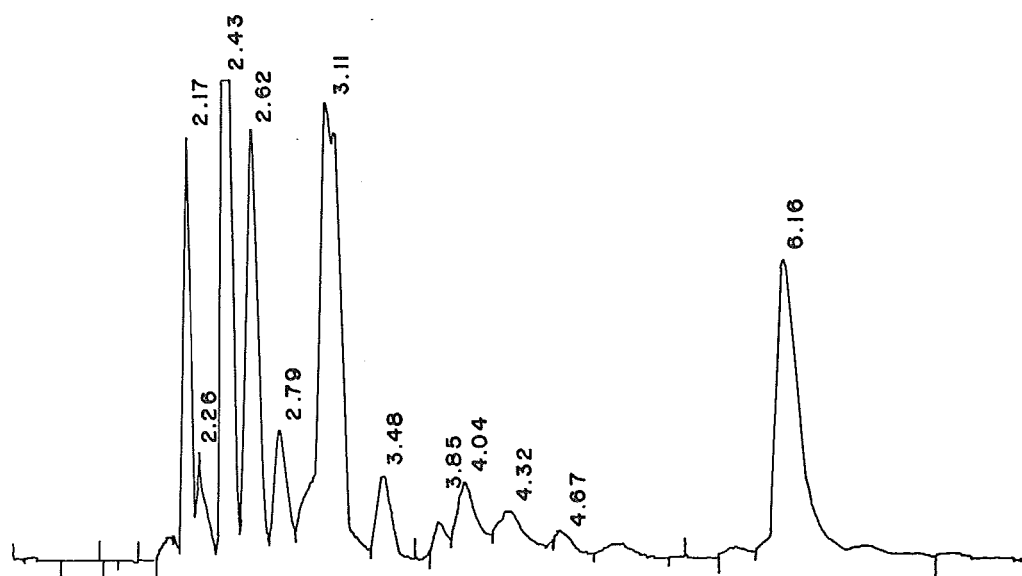
Los resultados se indican a continuación:

Columna SE-54.

La mejor separación se logró a 40°C. Esta separación se muestra en la figura 30 y su tabla correspondiente.

Columna de Carbowax 20 M

La mejor separación en esta columna se obtuvo siguiendo un programa de temperatura de 60 a 200°C (velocidad del programa



TR	AR/HT	AREA %
2.17	0.054	7.713
2.26	0.071	2.574
2.43	0.65	24.891
2.62	0.79	11.349
2.79	0.105	4.617
3.11	0.097	14.812
3.48	0.105	2.929
3.85	0.105	1.220
4.04	0.156	3.974
4.32	0.234	3.713
4.67	0.167	1.531
6.16	0.176	17.273

FIGURA 30

Separación de los compuestos volátiles del café en una columna SE-54 (40°C)

L = 25m DI = D.25mm.

Flujo de He: 1ml/min Detector: DIF (100°C) Inyector (100°C)

20°C/min). Los resultados se muestran en la figura 31. Se observa en el cromatograma que la mayor parte de los compuestos volátiles eluyen a 60°C.

Para operar con el sistema bidimensional se determinó trabajar con las siguientes temperaturas:

Columna SE-54: 40°C.

Columna de Carbowax 20 M: 60°C

3.3.3 Condiciones rutinarias de trabajo.

Estas condiciones se encuentran resumidas en el siguiente cuadro:

Gas acarreador: He

Flujo para la columna 1:
30ml/min

Flujo para la columna 2:
1ml/min

Detectores: DILL

Flujo de hidrógeno a los detectores:
30ml/min

T = 100°C

Flujo de aire a los detectores:
300ml/min

Gas auxiliar: N₂

Flujo: 30ml/min

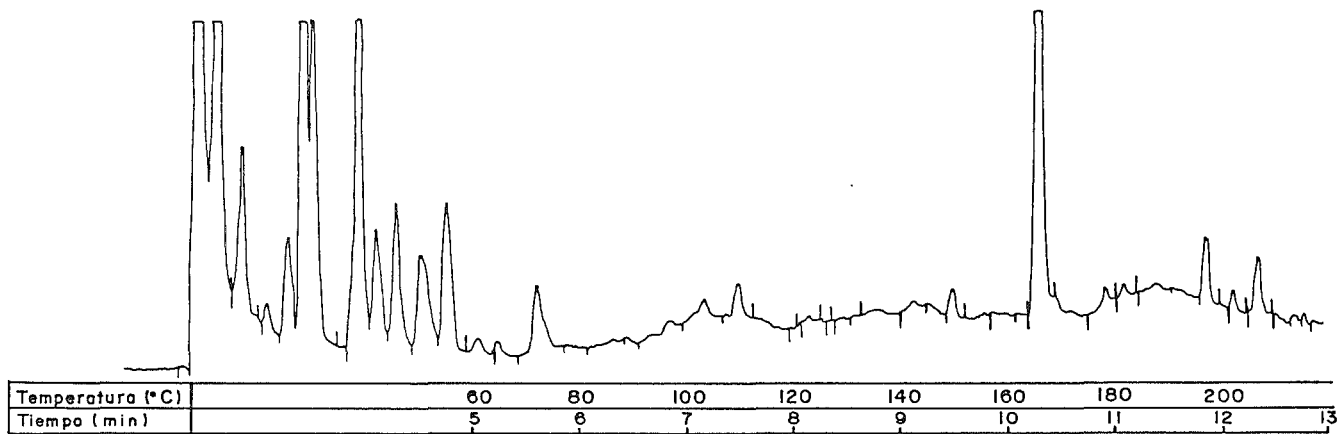
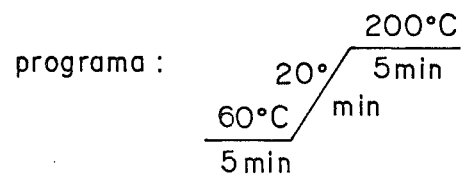


FIGURA 3I

Separación de los compuestos volátiles del café en una columna de Carbowax 20M programada de 60-200°C ; velocidad del programa de 20%/min L = 25 m ; D.I.= 0.25mm Flujo de He : 1ml/min. Detector : DIF (100°C) Inyector (100 °C)



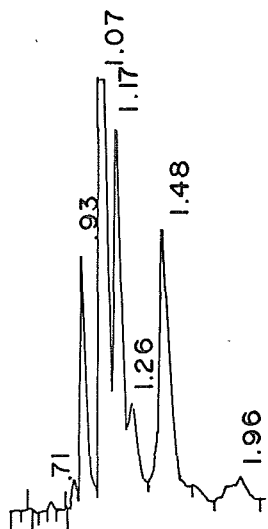
4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 SEPARACION BIDIMENSIONAL

Se trabajó con el sistema montado para cromatografía de gases bidimensional explicado en el inciso 3.2 y en las condiciones de trabajo consignadas en el inciso 3.3. El café analizado fue el café de Chiapas. Se inyectaron volúmenes de 250 μ l.

En primer lugar se obtuvieron los cromatogramas unidimensionales con cada una de las columnas, operando con la llave de seis pasos, en la posición a para la columna 1 (SE-54) y en la posición b para las dos columnas 1 (SE-54) + 2 (Carbowax 20M), de acuerdo con la figura 24. Las separaciones resultantes se muestran en las figuras 32 y 33. Ninguna de las dos columnas logra una separación satisfactoria, ni tampoco el empleo de ambas en serie.

Aplicando el proceso de división de muestra "Heart cutting" (inciso 2.3.2), se hicieron cortes de los picos obtenidos en la columna 1 y se transfirieron a la columna 2, accionando la llave de seis pasos y teniendo en cuenta los tiempos de retención en la columna 1. Los resultados de este proceso se muestran en las figuras 34,35,36,37 y 38. Se observa que cada pico se desdobra



TR	AR/HT	AREA %
0.15	0.037	0.341
0.71	0.030	0.236
0.87	0.040	0.896
0.93	0.041	7.634
1.07	0.043	45.152
1.17	0.056	15.681
1.26	0.075	5.843
1.48	0.095	19.555
1.96	0.191	3.928

FIGURA 32

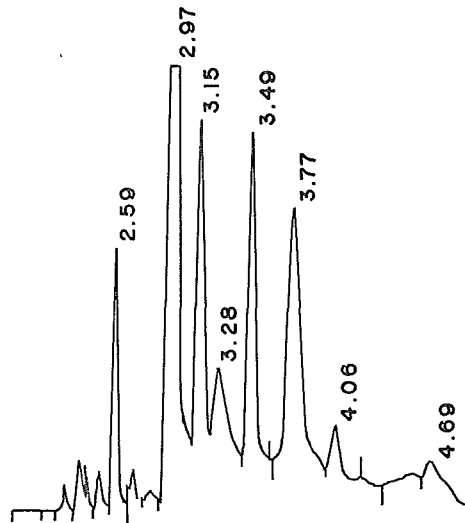
Muestra de Café

Cromatograma Unidimensional

Columna I: SE-54 L=25m D.l.= 0.25 mm

T- Columna: 40°C Flujo de He~30 ml/min

Detector: DIF (100°C) Inyector (100°C)



TR	AR/HT	AREA %
0.87	0.228	2.480
2.59	0.033	4.210
2.97	0.055	42.910
3.15	0.062	11.271
3.28	0.117	6.385
3.49	0.053	8.760
3.77	0.100	12.842
4.06	0.060	1.372
4.57	0.150	1.539
4.69	0.153	2.684

FIGURA 33

Muestra del Café
 Cromatograma Unidimensional
 Columna 1 + Columna 2: Carbowax 20 M (60°C)
 L= 25m D. I.= 0.25mm.
 Flujo de He ~ 1 ml/min
 Detector : DIF (100°C) Inyector (100°C)

en dos o más picos, lográndose una mejor separación que la encontrada con las columnas individuales.

Este desdoblamiento indica que un pico que parecía corresponder a un solo compuesto en realidad es una mezcla de dos o más constituyentes; es decir, la pureza de los picos obtenidos en la columna 1 no es suficiente.

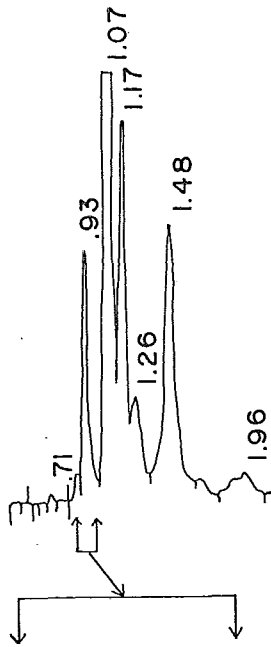
El incremento en la separación se debe a que la columna 2 (Carbowax 20M), tiene una polaridad diferente a la columna 1 (SE-54). La columna 2 es polar y la columna 1 es de polaridad baja (8). Con lo cual cambia su selectividad, y la transferencia controlada de picos se traduce en una resolución adicional. La columna SE-54 da una separación preliminar y la columna de Carbowax 20M actúa propiamente como columna analítica, separando los compuestos de las mezclas existentes.

En la parte superior de las figuras 34 a 38, señalada como A, aparece el cromatograma unidimensional de la muestra de café, obtenido en la columna SE-54 a 40°C; en cada caso se indica con flechas, el pico o los picos que se transfieren de la columna 1 a la columna 2.

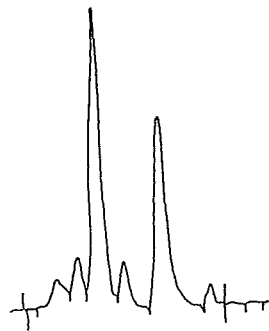
En la parte inferior de las figuras, señalada como B, se encuentra el cromatograma bidimensional, logrado al desarrollar en la columna 2, la región transferida.

Los picos se nombran por sus tiempos de retención (min), dados en la columna 1.

A



B



TR	AR/HT	AREA %
2.02	0.102	5.315
2.17	0.079	6.862
2.29	0.073	37.927
2.46	0.075	6.172
2.70	0.096	31.325
3.04	0.052	1.863

FIGURA 34

Muestra de café

"Heart-cutting" del pico 0.93

A: Cromatograma sobre SE-54

B: Cromatograma sobre Carbowax 20 M.

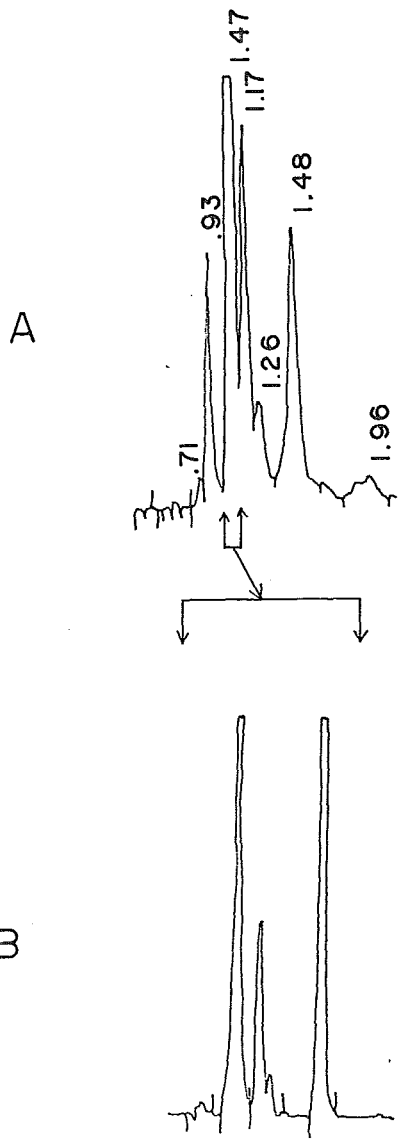


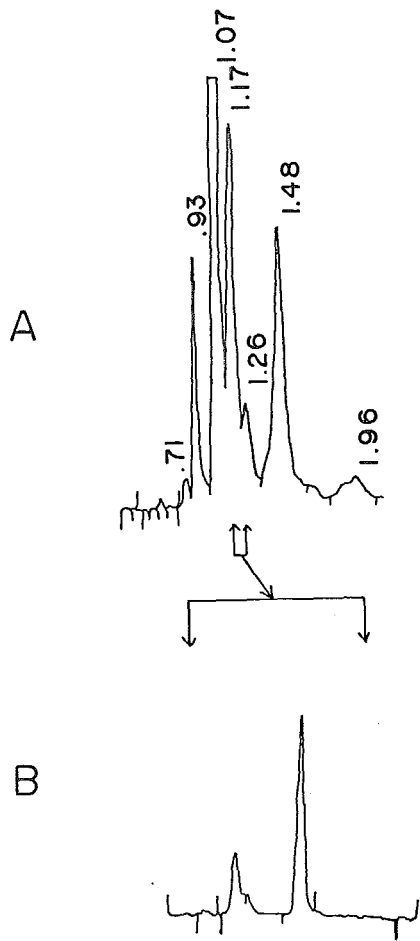
FIGURA 35

Muestra de café

"Heart-cutting" del pico 1.07

A : Cromatograma sobre SE-54

B : Cromatograma sobre Carbowax 20M



TR	AR/HT	AREA %
0.81	0.034	1.295
0.87	0.036	8.171
0.99	0.047	37.800
1.14	0.051	4.406
2.61	0.052	12.120
3.02	0.050	36.208

FIGURA 36

Muestra de Café

"Heart - cutting" del pico 1.17

A : Cromatograma sobre SE-54

B : Cromatograma sobre Carbowax 20M

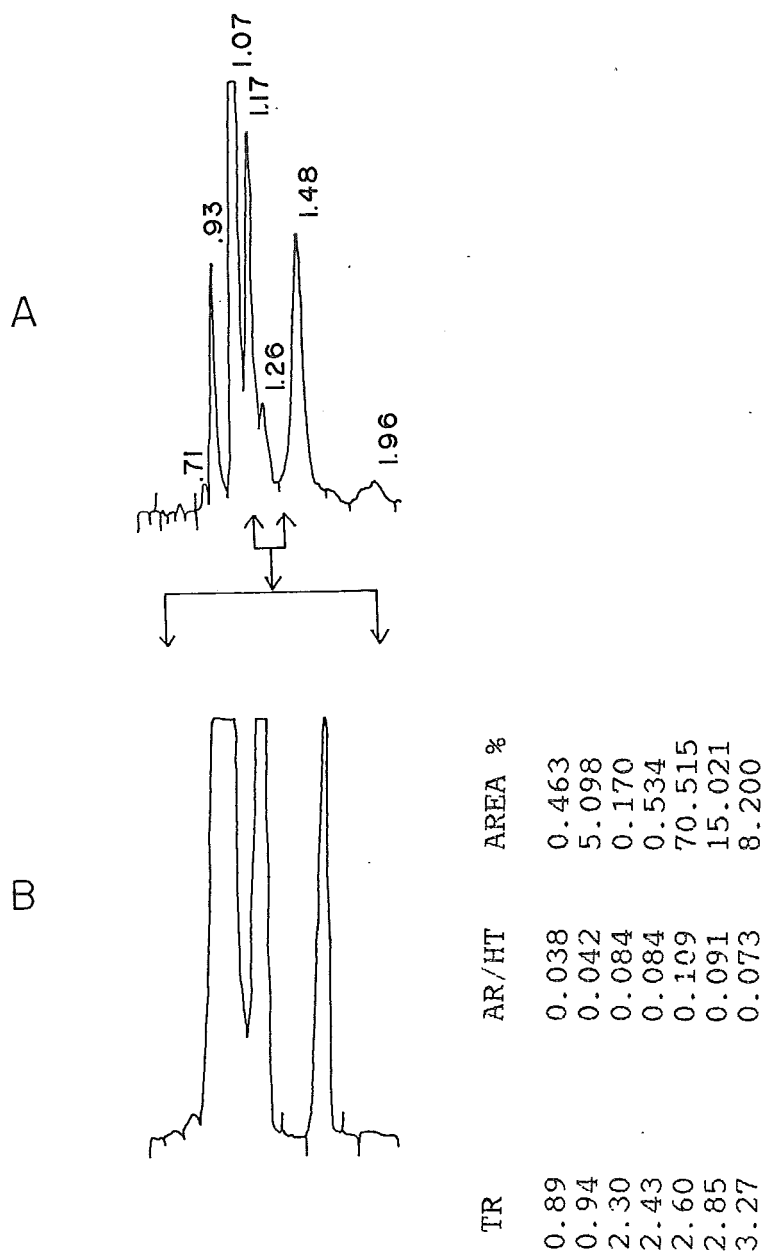


FIGURA 37

Muestra de café

"Heart-cutting" de los picos 1.17 y 1.26

A : Cromatograma sobre SE - 54

B : Cromatograma sobre Carbowax 20 M.

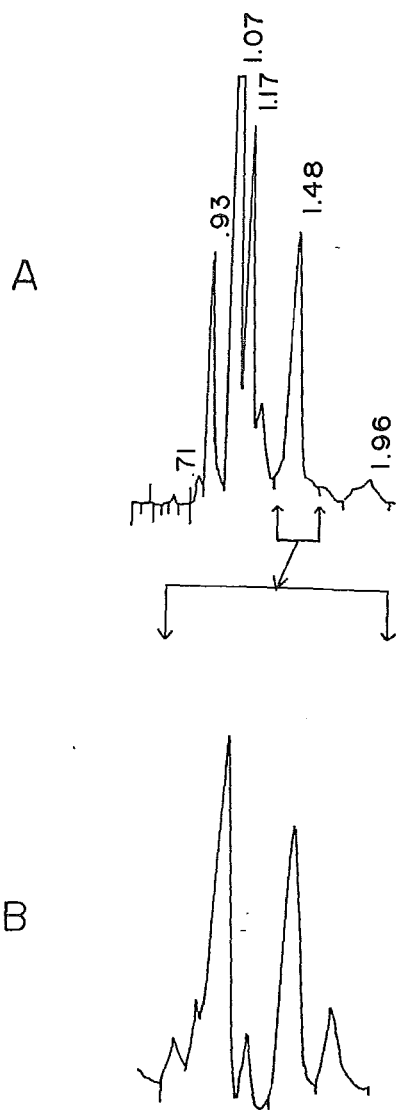


FIGURA 38

Muestra de Café

"Heart-cutting" del pico 1.48

A: Cromatograma sobre SE-54

B: Cromatograma sobre Carbowax 20 M

Analizando cada proceso "Heart cutting" efectuado, se encuentra:

-Pico 0.93 (figura 34).

Se desdobla en seis picos, dos de los cuales constituyen alrededor del 70% del área del cromatograma. El porcentaje restante se distribuye entre los cuatro componentes sobrantes.

-Pico 1.07 (Figura 35)

Al aplicar el proceso "Heart cutting", el pico 1.07 se convierte en cinco picos, tres de los cuales indican compuestos que se encuentran en concentraciones suficientemente altas de acuerdo al área obtenida.

-Pico 1.17 (Figura 36)

Este pico se desdobla en dos. En el primer pico se observa un "hombro" que sugiere que aún se trata de una mezcla; para separar los componentes de esta mezcla se requeriría desarrollar este pico en una tercera columna, o mayor eficiencia y/o selectividad.

-Picos 1.17 y 1.26 (Figura 37).

Transferir únicamente el pico 1.26 fue muy difícil debido a su cercanía con el pico 1.17, por este motivo se efectuó el "Heart cutting" de los dos picos unidos y se obtuvo un cromatograma bidimensional de tres picos. El pico 1.26 que aparece en el cromatograma A como un hombro, aparece en el cromatograma B, perfectamente resuelto.

-Pico 1.48 (Figura 38)

Este pico al ser transferido a la columna 2 se desarrolla en seis. Los dos primeros requieren de una mayor separación.

Los picos tercero y quinto constituyen la mayor proporción del cromatograma. Es sorprendente el hecho de que un pico se haya desdoblado en seis; ésto hace pensar en el enorme poder de separación de la cromatografía bidimensional.

Al comparar los dos cromatogramas unidimensionales con el conjunto de cromatogramas bidimensionales, podemos observar que en el cromatograma unidimensional logrado en la suma de columnas 1 + 2 (Figura 33) aparecen 12 picos, mientras que al hacer la suma de los diferentes cromatogramas bidimensionales, se encuentran un total de 21 picos. Esto nos indica que aún cuando con la columna 2 (Carbowax 20M) se logra una buena separación de los compuestos volátiles del café, el empleo del sistema cromatográfico bidimensional aporta una resolución adicional muy importante. Tanto más si el detector fuera más apropiado, para este caso debería emplearse un detector fotométrico de llama (DFLL).

4.2 IDENTIFICACION DE COMPUESTOS SEPARADOS

Tabla XIII. Compuestos volátiles del café identificados por CGBD

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	
	Columna 1	Columnas 1 + 2
Acetaldehido	0.82	2.36
Naftaleno	0.81	2.79
Metanol	0.81	2.75

Furfural	0.93	2.63
Catecol	0.93	2.73
Acetona	0.93	2.74
Propanol	0.96	2.83
Formiato de etilo	0.96	2.82
Tiofeno	0.93	2.84
Etanol	0.92	3.04
Formiato de metilo	0.99	2.48
Acetato de metilo	1.02	2.90
n-pentano	0.97	2.40
Cloruro de metileno	1.06	3.15
1-propanol	1.12	4.30
ácido fórmico	1.10	4.32
cloroformo	1.36	2.08
Hexano	1.31	2.76
Butanona	1.24	3.40
Metiletetilcetona	0.99	2.48
Acetato de etilo	1.30	3.44
Diacetil	1.18	3.88
Tolueno	1.63	3.12
Ciclohexano	1.82	3.56
Benceno	1.86	4.30
1-Butanol	1.74	6.74

A pesar de la resolución adicional ofrecida por la CGBD se presentaron algunas mezclas como catecol y acetona, propanol y formiato de etilo, 1-propanol y ácido fórmico. Esto significa

que se requiere mayor resolución, la cual puede lograrse optimizando el sistema o valiéndose de una tercera columna (cromatografía de gases tridimensional). Los compuestos propuestos por esta identificación deben ser confirmados por espectrofometría de masas.

En el apéndice II se comenta sobre la importancia que tienen en el aroma del café algunos compuestos identificados.

4.3 COMPARACION DE TECNICAS.

A continuación se comparan las técnicas empleadas en esta tesis con las técnicas aplicadas con el mismo objetivo en investigaciones recientes.

El análisis "Head space" empleado en este trabajo es de diseño sencillo y de control fácil; estas ventajas contrastan con el complicado sistema de purga y trampa usado por T.H. Wang et al en su investigación (35).

Comparando el análisis "Head space" con el empleo del pirolizador por K. Harada (38), se observa un cambio fundamental en los cromatogramas de las figuras 19 y 20 de la página 65. Estos cambios pueden deberse a una alteración química de los compuestos volátiles del café en su paso por el pirolizador. Este resultado hace pensar en la conveniencia del análisis "Head space" sobre el pirolizador para el estudio de los compuestos volátiles del café con las ventajas mostradas en el presente trabajo.

T.H. Wang et al. (35) emplearon en su investigación un "Heart cutting" discontinuo, el cual puede llevar a pérdida de

muestra y contaminación; el sistema "heart cutting" usado en el presente estudio no da lugar a esas desventajas y es el más apropiado para trabajar con dos columnas capilares.

Otra diferencia con el trabajo de Wang, es el empleo de dos columnas capilares en lugar de una empacada y una capilar; el análisis con columnas capilar-capilar presenta la posibilidad de obtener dos series de datos independientes sobre índices de retención. Por otra parte su empleo mejora la resolución de las separaciones.

Además de la resolución adicional que presenta la CGBD sobre la CG unidimensional existen otras ventajas que la hace atractiva para el análisis de muestras complejas. Por ejemplo, en muchos análisis se desea una separación de alta resolución solamente para una pequeña porción de la muestra, la cual es transferida a la columna principal; de esta manera, la columna principal se protege de materiales polares perjudiciales y de resinas que con frecuencia se encuentran en muestras con un extenso intervalo en los puntos de ebullición. También se puede evitar el uso de temperaturas altas que acortan la vida de las columnas y aumentan la actividad de la superficie (48).

5 CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

- Con respecto a la preparación y concentración de la muestra, el análisis "Head space" presenta ventajas significativas sobre los demás métodos, las cuales se traducen en disminución del tiempo de análisis, simplicidad de operación y bajo costo.
- Para el caso particular del café, es posible incrementar la sensibilidad del análisis "Head space" operando el sistema a presión atmosférica, con un tiempo de equilibrio de 30 minutos, a una temperatura entre 80 y 90°C.
- Aún, trabajando con sistemas de alta resolución, los cromatogramas de muestras complejas (en este caso el café), revelan muchas regiones pobremente resueltas que contienen picos traslapados.
- Para estas muestras complejas que requieren resolución adicional, se hace necesaria la cromatografía de gases bidimensional.
- Con frecuencia la fracción de muestra es tan pequeña que permite realizar el análisis cromatográfico a temperatura constante con los beneficios asociados a este tipo de operación como son: incremento en la estabilidad de la línea base, mediciones más exactas de los datos de retención, optimización de las condiciones de la columna y extensión de la vida de la columna.

- Este estudio demuestra la alta capacidad de resolución de la cromatografía de gases bidimensional.
- El sistema ideal para CGBD debe incluir un detector selectivo.
- El sistema montado presenta ciertas limitaciones como son: volúmenes muertos con la consecuente reducción de la eficiencia; uso de válvulas de aguja, conexiones y tubería, componentes que causan adsorción y/o contaminación.
- A pesar de las limitaciones observadas se cumple el fin último de la cromatografía, el cual es la separación del mayor número de sustancias posibles en el menor tiempo.
- Se logró el objetivo principal del presente trabajo, el cual era diseñar, montar y poner en funcionamiento un sistema para cromatografía de gases bidimensional, que se espera sea de utilidad en futuros estudios de muestras complejas.
- Como trabajo posterior se propone:
 - Optimizar el sistema bidimensional montado.
 - Acoplar la CGBD (capilar-capilar) a la espectrometría de masas con el fin de lograr una mejor identificación de los compuestos volátiles del café.
 - Analizar varios tipos de café con el objeto de estudiar sus diferencias químicas y en consecuencia buscar métodos tendientes a mejorar el aroma de ciertas variedades. En el apéndice I se comparan los perfiles cromatográficos de cuatro tipos de café.

APENDICE I

COMPARACION CROMATOGRAFICA DE VARIOS TIPOS DE CAFE

Se compararon los perfiles cromatográficos de cuatro tipos de café:

- Café del estado de Chiapas
- Café Colombiano
- Nescafé Ristreto
- Café "Internacional" de Córdoba

Los resultados se muestran en las figuras 39,40,41 y 42.

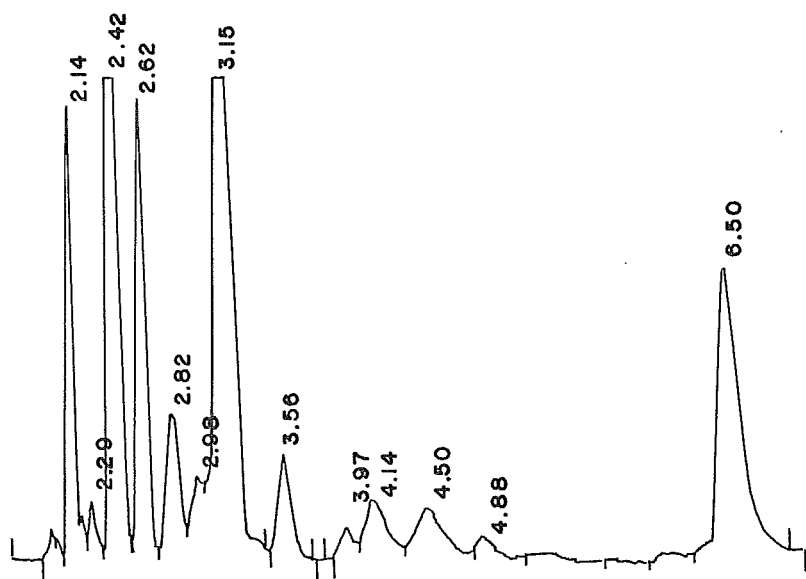
Se observa similitud entre los cromatogramas del café de Chiapas y el café Colombiano, con una diferencia notable en el pico a T_R 6.50, el cual es muy prominente en el café de Chiapas y no se detecta en el café Colombiano; surge la inquietud por conocer si el compuesto o los compuestos enmarcados en ese pico contribuyen a mejorar o desmejorar el aroma del café. En futuros trabajos puede analizarse este aspecto, ya que un entendimiento completo de las diferencias químicas existentes entre varios tipos de café puede usarse para mejorar ciertas variedades. Tal mejoramiento, tiene que ver con el tiempo, temperatura y forma de tostado (41). Algunos cambios en los parámetros de tostado representan cambios en las condiciones de las reacciones, las cuales pueden alterar las velocidades y trayectorias de algunas

reacciones, cambiando por consiguiente varios de los constituyentes del aroma en forma cuantitativa y/o cualitativa.

Algunos picos observados en el café de Chiapas no aparecen en el café Colombiano o viceversa (figuras 39 y 40): al respecto es importante tener en cuenta el poder de los detectores cromatográficos. Así, el hecho de que un detector determinado, en este caso el detector de ionización de llama, no detecte ciertos componentes no constituye una prueba de que esos compuestos no estén presentes en la muestra analizada.

De otra parte, se encuentra mucha semejanza en los perfiles cromatográficos del nescafé Ristreto y el café Internacional de Córdoba (figuras 41 y 42). En estos dos cromatogramas se observa una disminución en el número y la intensidad de los picos en comparación con los cromatogramas obtenidos para los cafés de Chiapas y Colombiano; este resultado se debe probablemente a que en estos tipos de café solo están presentes los compuestos solubles en agua y además a la alteración de los constituyentes durante el proceso de preparación de estos productos.

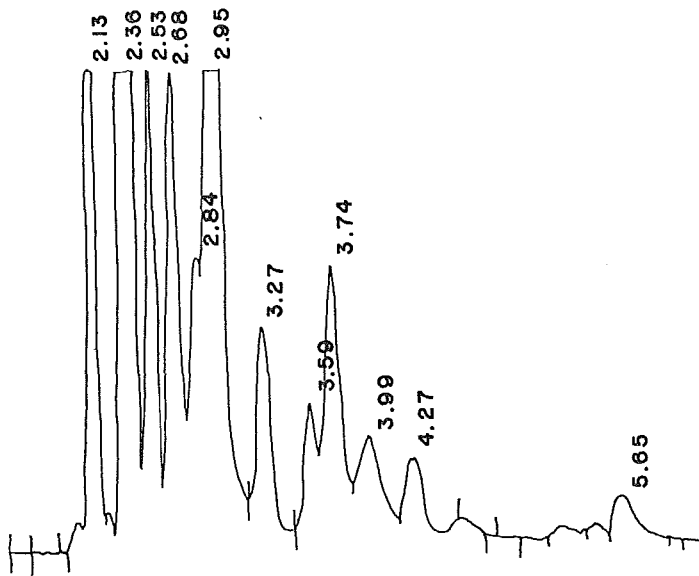
En conclusión, los tipos de café sometidos a un mismo proceso tecnológico presentan cromatogramas semejantes cuya variación fundamental se da en el aspecto cuantitativo.



TR	AR/HT	AREA %
2.14	0.049	6.776
2.29	0.066	1.182
2.42	0.064	21.327
2.62	0.076	10.398
2.82	0.109	4.685
2.98	0.078	1.798
3.15	0.141	24.653
3.56	0.100	3.065
3.97	0.104	1.036
4.14	0.176	3.305
4.50	0.236	3.776
4.88	0.166	1.261
6.50	0.180	15.901

FIGURA 39

Café del Estado de Chiapas (México)
 Columna SE-54 (40°C) Flujo de He = 1 ml/min
 L = 25m D.I. = 0.25mm.
 Detector : DIF (100°C) Inyector (100°C)



TR	AR/HT	AREA %
2.13	0.061	5.989
2.36	0.055	55.223
2.53	0.075	4.136
2.68	0.094	4.887
2.84	0.080	2.408
2.95	0.103	13.497
3.27	0.089	1.938
3.59	0.097	1.450
3.74	0.122	3.800
3.99	0.176	1.892
4.27	0.105	0.841
5.65	0.169	0.899

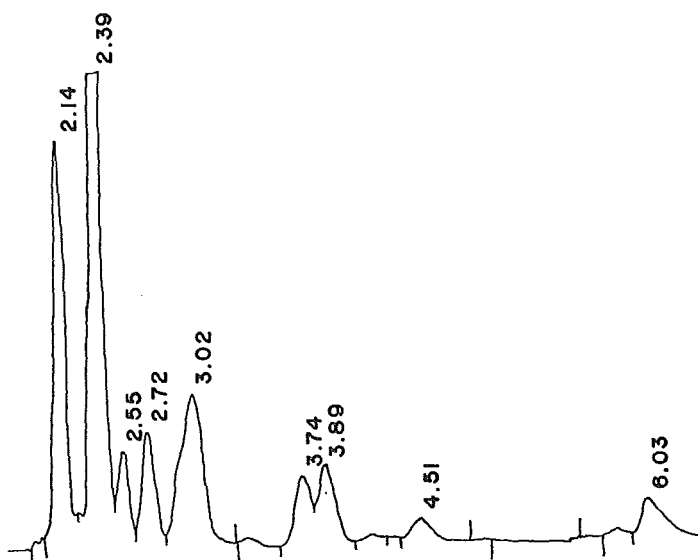
FIGURA 40

Café Colombiano

Columna SE - 54 (40°C) Flujo de He = 1 ml/min

L = 25m D.I. = 0.25 mm.

Detector: DIF (100°C) Inyector (100°C)



TR	AR/HT	AREA %
1.50	0.350	1.602
2.14	0.080	17.621
2.39	0.086	41.113
2.55	0.085	4.314
2.72	0.095	5.790
3.02	0.161	13.130
3.74	0.120	4.639
3.89	0.131	5.786
4.51	0.153	2.022
6.03	0.190	3.983

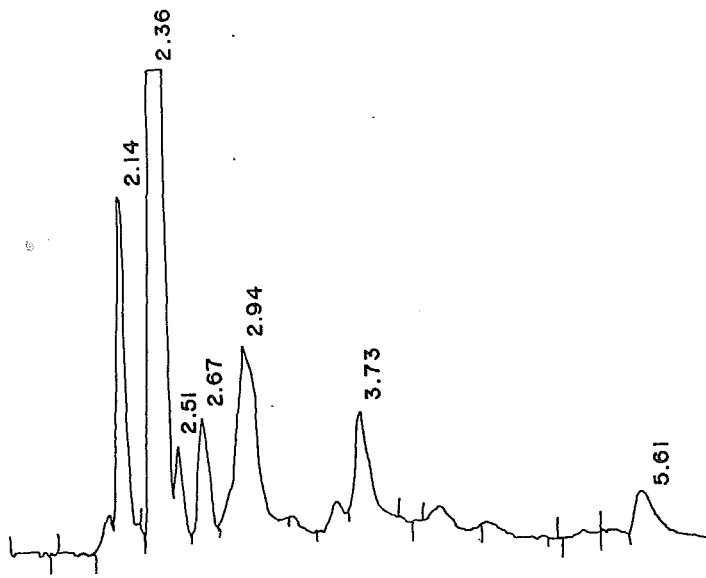
FIGURA 4I

Nescafé Ristreto

Columna SE-54 (40°C) Flujo de He: 1 ml/min

L = 25 m D.I = 0.25 m.m

Detector: DIF (100°C) Inyector (100°C)



TR	AR/HT	AREA %
2.14	0.061	7.068
2.36	0.061	68.973
2.51	0.066	1.952
2.67	0.078	3.061
2.94	0.160	10.146
3.73	0.114	4.309
5.61	0.169	2.534

FIGURA 42

Café "Internacional" de Córdoba

Columna SE-54(40°) Flujo de He: 1ml/min

L=25m D.I.= 0.25 m.m.

Detector: DIF (100°C) Inyector (100°C)

APENDICE II

COMPUESTOS VOLATILES IDENTIFICADOS EN EL CAFE

A continuación se comenta sobre varios de los compuestos identificados como constituyentes volátiles del café (42):

- Acetaldehído (Teb 21°C).

Es muy volátil. Se encuentra en la mayoría de las frutas. Solo se encuentra en forma perceptible en el café recientemente tostado y molido. Análisis cromatográficos de café instantáneo muestran un contenido alto de acetaldehído en relación con el encontrado en café tostado; esto puede significar que el acetaldehído se produce en la hidrólisis del café tostado. Es irritante de las membranas mucosas.

- Propionaldehído (Teb 49°C)

Es el homólogo superior más próximo al acetaldehído. Se encuentra también en muchas frutas y tiene un aroma que sugiere ciruelas pasas o manzanas demasiado maduras. Se encuentra en mayor cantidad en café tostado que en café soluble. Es un contribuidor normal del aroma del café.

- Acetona (Teb 57°C)

Se encuentra en café tostado. Tiene un olor característico dulce y picante.

- Diaçetil (Teb 88°C)

Tiene un aroma a mantequilla endulzada. Es un constituyente deseable en el aroma del café.

- Alcohol metílico (Teb 64°C)

Se encuentra en café tostado en bajas concentraciones.

- Formiato de metilo (Teb 32°C)

Forma parte del aroma de café tostado.

- Formiato de etilo (Teb 54°C)

Forma parte del aroma de café tostado.

- Furfural (Teb 162°C)

Es el aldehído del furano. No es agradable cuando está concentrado, pero es dulce y agradable en bajas concentraciones. Su olor es similar al pan y salvado. Se presenta en mayor proporción en café soluble que en café tostado. Puede causar irritación de las membranas mucosas.

- Tiofeno (Teb 84°C)

Está presente en café tostado, aunque es un compuesto azufrado no tiene olor fuerte.

- Piridina (Teb 115°C).

Presenta un olor repulsivo. Se encuentra en café tostado. Un contenido alto en piridina es un hecho característico de café demasiado tostado. Una buena parte del olor repugnante del café añejo puede deberse a la pérdida de volátiles aromatizantes, permitiendo que predomine el olor de la piridina. Se detecta a razón de 3 ppb en aire.

Los compuestos azufrados se encuentran en el aroma del café en muy bajas concentraciones. Estos compuestos son muy volátiles, tienen olores potentes y presentan muy bajos niveles de detección. Los constituyentes azufrados volátiles juegan un

papel importante en la caracterización del aroma y sabor placenteros en el café; aunque no fueron identificados se describen por considerarse relevantes en el aroma en cuestión.

- Sulfuro de dimetilo, SDM (Teb 38°C)

Aunque los olores sulfurosos son con frecuencia desagradables por formar parte muchas veces de sustancias podridas, el olor del sulfuro de dimetilo en concentraciones de ppb en el café le imparte propiedades esenciales de alta calidad a este producto.

Los constituyentes azufrados volátiles del café provienen de proteínas que contienen azufre; los aminoácidos azufrados son metionina, cistina y cisteína y son excepcionales ya que la mayoría de las proteínas no contienen azufre.

"El aroma detectable del SDM puede reconocerse en una taza de café Colombiano" (42).

El SDM está ausente en cafés instantáneos.

- Metilmercaptano (Teb 8°C)

Su olor se asocia al de coles podridas, sin embargo es un constituyente importante del aroma del café, el cual en sus concentraciones bajas usuales y mezclado con otros olores es muy placentero.

- Disulfuro de carbono (Teb 46°C)

A pesar de no presentar un olor fuerte como el de los sulfuros orgánicos o mercaptanos, es un constituyente importante del aroma.

REFERENCIAS

1. Jennings, W., Gas Chromatography with Glass Capillary Columns. Academic Press, N.Y. (1980)
2. Poole, C.F. and Schuette, S.A., Contemporary Practice of Chromatography. Elsevier, Amsterdam (1984)
3. Davis, J.M. and Giddings, J.C., Anal. Chem. 55, 418 (1983).
4. Ettre, L.S., J. Chromatogr. 165, 235 (1979)
5. Ettre, L.S., J. Chromatogr. 220, 65 (1981)
6. McNair H.M., Cromatografía de gases. Secretaría general de la OEA, Washington, D.C. (1981)
7. McNair H.M., Capillary Gas Chromatography. Virginia Tech. (1985)
8. McNair, H.M. and Bonelli, E.J., Basic Gas Chromatography. Consolidated Printers, Berkeley, California (1969)
9. Message, G.M., Practical Aspects of Gas Chromatography/Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, N.Y. (1984).
10. Golay, M.J.E., Anal. Chem. 29, 928 (1957)
11. Ettre, L.S., Chromatographia 16, 18 (1982).
12. DiNunzio, J.E. et al., Chromatographia 15, 641 (1982)
13. Saito, H., J. Chromatogr. 243, 189 (1982)
14. Desty, D.H. and Douglas, A.A., J. Chromatogr. 142, 39 (1977)
15. Gelover S., S.L., Estudio de fases estacionarias en Cromatografía de gases. Tesis, UNAM (1988)

16. Lawrence, J.F., Anal. Chem. 52, 1122A (1980)
17. Drozd, J. and Novak, J., J. Chromatogr. 165, 141 (1979)
18. Berezkin, V.G., Anal. Chem. 11, 1 (1981)
19. Wolf, C.J. et al., Anal. Chem. 52, 348A (1980)
20. Wylie, P.L., Gas Chromatography, Application Note 288-45, January (1986)
21. Ioffe, B.V. and Vitenberg, A.G., Head-Space Analysis and related Methods in Gas Chromatography. John Wiley & Sons, N.Y. (1984)
- 22a. Novak, J. et al., Anal. Chem. 37, 661 (1965)
- 22b. Dravnieks, A. and Krotoszynski, B.K., J. Gas Chromatogr. 4, 367 (1966).
23. Weurman, C., J. Agric. Food Chem. 17, 370 (1969)
24. Kolb, B. et al., J. Chromatogr. 204, 371 (1981)
25. Kolb, B. et al., J. Chromatogr. 279, 341 (1983)
26. Friant, S.L. and Suffet, I.H., Anal. Chem. 51, 2167 (1979)
27. Drozd, J. et al., J. Chromatogr. 158, 471 (1978)
28. Dravnieks, A. and O'Donnell, A., J. Agr. Food Chem. 19, 1049 (1971)
29. Tassan, C.G. and Russel, G.F., J. Food Sci. 39, 64 (1974)
30. Gordon, B.M., Rix, C.E. and Borgerding, M.F., J. of Chromatographic Science 23, 1 (1985)
31. Deans, D.R., Chrom 13, 222 (1981)
32. Deans, D.R., Chromatographia 1, 18 (1968)
33. Elder J.F., et al., J. Chromatogr. Sci. 24, 26 (1986)
34. Schomburg, G. et al., Chromatographia 16, 87 (1983)
35. Wang, T.H. et al., Chromatographia 17, 411 (1983)
36. Vitzthum, O.G. et al., J. Agric. Food Chem. 39 1210 (1974)

37. Vitzthum, O.G. et al., J. Agric. Food Chem. 23, 999 (1975)
38. Harada, K. et al., J. of Chromatography 19, 457 (1987)
39. Arroyo, I., Trabajo monográfico, UNAM (1987)
40. Sivetz, M. and Desrosier, N.W., Coffee Technology. Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut (1979)
41. Yamanishi, T., Flavor Research. Chapter 8. Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1981)
42. Sivetz, M., Coffee Processing Technology. The Avi Publishing Company, Inc. (1963)
43. Dowty, B. et al., J. Chromatogr. Sci. 289, 117 (1984)
44. Dressler, M., J. Chromatogr. 165, 167 (1979)
45. Ogden, M.W. and McNair, H.M., J. of High Resolution Chromatography 8, 326 (1985)
46. Bertsch, W. and Jennings, W.G., Recent Advances in Capillary Gas Chromatography. R.E. Kaiser Editors (1981)
47. Crane, the Engineering Division, Flow of Fluids Through Valves, Fittings and Pipe. Crane Co. (1969)
48. Freeman, R.R., High Resolution Gas Chromatography Hewlett-Packard Company (1981)
49. Karger, B.L. and Snyder, L.R., Introduction to Separation Science. Wiley (1973)
50. Rojo, C., Francisco, Comunicación personal.