

INTRODUCCIÓN

Los aceites vegetales bromados han sido ampliamente utilizados como aditivos para alimentos y específicamente en la industria de refrescos como agentes ajustadores de densidad de los aceites cítricos saborizantes.

A pesar de que se ha permitido el uso de dichos compuestos como aditivos para alimentos, existe una gran cantidad de estudios¹⁻⁹ que señalan la toxicidad de los mismos. Como resultado de estos reportes, el uso de los aceites bromados ha sido prohibido en algunos países, y dónde sí se permiten, solo es posible utilizarlos hasta una concentración máxima de 15 ppm¹⁰. Por lo que resulta importante desarrollar un método analítico para su cuantificación.

Al realizar un estudio bibliográfico sobre el tema se encontraron reportados diversos métodos¹¹⁻²⁰, destacando la cromatografía de gases como una de las técnicas más utilizadas. Efectivamente, la cromatografía de gases ha sido ampliamente

utilizada para el análisis de los aceites vegetales bromados a pesar de que las condiciones de trabajo necesarias para el desarrollo de dicha técnica provocan la descomposición de los aceites bajo análisis²¹⁻²³. Por otra parte, utilizando esta técnica se dificulta el análisis de los compuestos hexabromados a menos que se utilice una columna capilar¹⁹.

La cromatografía de líquidos es la opción más viable para el análisis de los compuestos que ocupan nuestro interés en éste estudio, ya que con esta técnica deben eliminarse los problemas de la descomposición del producto bajo análisis y de la determinación de los compuestos hexabromados.

Lawrence, Chadha y Conacher¹¹ utilizaron un método de cromatografía de líquidos con detección UV a 220 nm para la caracterización de aceites vegetales bromados, pero no desarrollaron una metodología para el análisis de los mismos en refrescos.

En este trabajo se desarrolla un método analítico para cuantificar aceites vegetales bromados en refrescos, utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución.

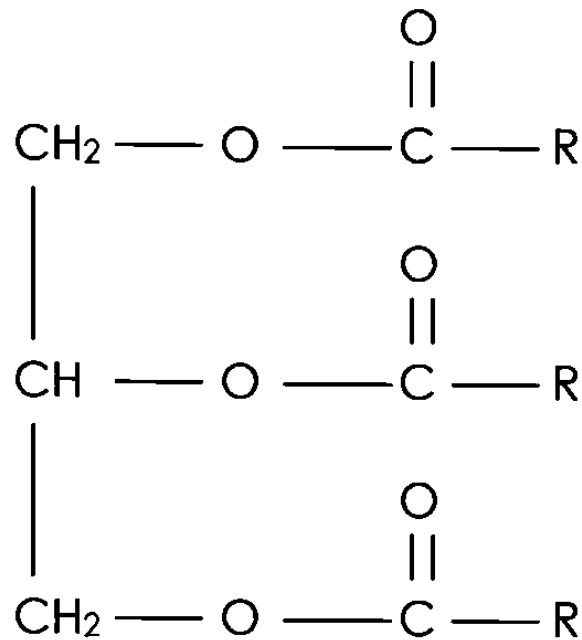
CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Naturaleza Química de los Aceites Vegetales Bromados

Los aceites vegetales bromados (AVB) se obtienen sometiendo los correspondientes aceites vegetales a una reacción de bromación. Los aceites vegetales más utilizados para este propósito son el aceite de maíz, el aceite de soya y el aceite de algodón; sin embargo, también se encuentra reportado en la literatura la bromación de otros aceites como por ejemplo los de: ajonjolí, girasol, canola, jojoba y aguacate²⁴.

Dicha reacción se lleva a cabo sobre la porción insaturada de la molécula de triglicérido que constituye el aceite vegetal y que en la mayoría de los aceites proviene, principalmente, de los ácidos oleico, linoleico y linolénico (figura 1). Por lo tanto, sí se somete un aceite vegetal bromado a una reacción de



R = Cadena Derivada de Ácido Graso.

Figura 1. Molécula de Triglicérido. Los Ácidos, de Dónde Proviene la Porción Insaturada de la Mayoría de los Triglicéridos, son los siguientes:

Ácido Oleico: $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

Ácido Linoleico: $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

Ácido Linolénico: $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH})_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

transesterificación con metanol se deben obtener, principalmente, los siguientes derivados bromados: dibromoestearato de metilo (DBEM), tetrabromoestearato de metilo (TBEM), y hexabromoestearato de metilo (HBEM). El porcentaje obtenido de cada uno de esos productos dependerá, evidentemente, de la composición química del aceite vegetal de partida.

En la tabla I se reporta la composición química de los aceites de maíz y de soya. Se obtiene del análisis de esa información que al transesterificar el aceite bromado de maíz cabe esperar la formación de DBEM y TBEM; en el caso del aceite bromado de soya, además de los productos anteriores, se debe obtener el HBEM.

1.2 Aplicación de los Aceites Vegetales Bromados

Los refrescos con sabores cítricos como los de naranja y lima-limón se encuentran entre los favoritos de los consumidores de ese tipo de bebidas. Estos sabores están constituídos principalmente por los aceites esenciales obtenidos de algunas frutas: por ejemplo, naranja, limón, toronja, etc. Sin embargo, la dispersión de estos aceites esenciales en el refresco constituye un problema debido a la insolubilidad de los mismos en agua; eso

obliga a incorporar agentes emulsificantes en la formulación de la bebida. Así mismo, considerando que la habilidad de los agentes emulsificantes para mantener el aceite en suspensión es proporcional al tamaño de partícula, las partículas de aceite son reducidas por atomización.

TABLA I
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES VEGETALES

ÁCIDO	% EN ACEITE DE MAÍZ	% EN ACEITE DE SOYA
Mirístico	< 0.1	< 0.5
Palmítico	8 - 19	7 - 14
Palmitoleico	< 0.5	0.5
Esteárico	0.5 - 4	1.4 - 5.5
Oleico	19 - 50	19 - 30
Linoleico	34 - 62	44 - 62
Linolénico	< 2.0	4 - 11
Araquídico	< 1.0	< 1.0
Eicosenoico	< 0.5	< 1.0
Docosanoico	< 0.5	< 0.5
Tetracosanoico	< 0.5	-

Por otra parte, no es suficiente lograr la emulsión del aceite en el refresco, sino que además esta debe ser estable al menos seis meses. Un problema para conseguir dicha estabilidad es la baja densidad de los aceites esenciales. En general, los aceites cítricos tienen una gravedad específica en el intervalo de 0.845 a 0.890

g/cm^3 mientras que un refresco con un 10 a un 12% de azúcar tiene una gravedad específica de 1.038 a 1.046 g/cm^3 . Para solucionar este problema se utilizan los aditivos de peso, también denominados agentes ajustadores de densidad, y que son compuestos que se añaden a los aceites esenciales para aumentar su gravedad específica y ayudar a mantener una dispersión estable del aceite. Un ejemplo de este tipo de aditivos lo constituyen los aceites vegetales bromados.

Los aceites vegetales bromados fueron utilizados por primera vez, como agentes ajustadores de densidad de aceites esenciales en bebidas en la década de los años 40. Los aceites vegetales bromados obtenidos a partir del aceite de oliva tienen una gravedad específica de alrededor de 1.24 g/cm^3 y los obtenidos a partir de aceites de soya, de maíz o de algodón, de alrededor de 1.33 g/cm^3 . Debido a su alta gravedad específica los AVB son considerados como agentes ajustadores de densidad muy efectivos para los aceites cítricos. Además proporcionan turbidez u opacidad a los refrescos lo cuál en algunos casos es una ventaja.

1.3 Regulación de los Aceites Vegetales Bromados

Dependiendo de los aceites cítricos utilizados, normalmente

se requieren de 120 a 160 ppm del AVB para lograr una emulsión estable del aceite saborizante en el refresco. Sin embargo, en 1966, el Comité de Aditivos Para Alimentos de la Agrupación "World Health Organization" expresa su preocupación acerca de la posibilidad de la acumulación de bromo en los tejidos del cuerpo cuándo los AVB fueran utilizados en productos alimenticios de consumo humano. Desafortunadamente, diversos estudios sobre los efectos tóxicos de los AVB en animales de laboratorio¹⁻⁹ han confirmado esa sospecha.

A pesar de que no existen pruebas sobre efectos patológicos específicos en el ser humano, el uso de los AVB como aditivos para alimentos fue prohibido en la India, Inglaterra y en otros países europeos. En algunos países como Estados Unidos, Canadá, Australia, España, Finlandia, Noruega, Israel, Kenya y Sudáfrica su uso fue limitado a 15 ppm¹⁰ en el refresco final.

1.4 Métodos de Análisis de Aceites Vegetales Bromados

Considerando la estricta regulación a que están sometidos los AVB, se comprende la importancia de contar con un método analítico para su cuantificación. Al realizar una investigación bibliográfica sobre el tema se encontraron reportados diversos

métodos de análisis de AVB, destacando las contribuciones del grupo de trabajo de H.B.S. Conacher. A continuación se describen brevemente algunos de los estudios más relevantes.

Deana L. Turner¹² desarrolló un método para cuantificar AVB en refrescos basado en la determinación de bromo total en la muestra. Utilizando un procedimiento de debromación en conjunto con un electrodo específico de ion bromuro, y trabajando a niveles de 15 ppm del AVB, se reporta un 93% de recuperación, una precisión de ± 1 ppm y una exactitud de $\pm <1$ ppm.

Otro método, basado también en la determinación de bromo total, es el que reportan M.S. Green y G. Keen¹³. Los autores describen un método colorimétrico donde el bromo es liberado del aceite utilizando dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado; posteriormente, este se hace reaccionar con una solución de ácido barbitúrico-piridina en presencia de cianuro de potasio para dar un color morado. De acuerdo a los autores los resultados obtenidos en la determinación de bromo en AVB coinciden con los de otros métodos pero no proporcionan más detalles.

Los investigadores del Central Food Technological Research

Institute of Mysore¹⁴ desarrollaron una técnica rápida para detectar bajos niveles de AVB en refrescos. La prueba involucra la extracción del AVB del refresco y su tratamiento con polvo de zinc para convertir el bromo orgánico a su forma inorgánica. Posteriormente se trata la muestra con dióxido de plomo, para liberar bromo, que puede ser detectado por el cambio de color de la fluoresceína con la que es puesto en contacto. Según los autores la prueba puede detectar hasta 1.5 ppm de AVB en refrescos.

H.B.S. Conacher y Arthur D. McKenzie¹⁵ comparan tres métodos de determinación de bromo en AVB: 1) titulación yodométrica, 2) titulación potenciométrica y 3) titulación utilizando electrodo específico de bromuro. Ellos concluyen que tanto la titulación potenciométrica como la yodométrica son aceptables para una determinación precisa de bromo en AVB. Con la tercer técnica reportan resultados mas bajos y variables.

En la revisión bibliográfica realizada se encontró que una de las técnicas más empleadas para la cuantificación de AVB era la cromatografía de gases. H.B.S. Conacher, R.K. Chadha y M.R. Sahasrabudhe¹⁶ se encuentran entre los primeros en reportar el uso

de esa técnica. El procedimiento utilizado por ellos involucra el tratamiento de los aceites bromados con metóxido de sodio, seguido del análisis por cromatografía de gases de los ésteres metílicos resultantes. Empleando una columna empacada con 3% JXR en Gas Chrom Q, de malla 110-120, y como estándar interno pentadecanoato de metilo logran recuperaciones en el intervalo de 93.7 a 102.4%. Aplicando su técnica a varios refrescos comerciales encontraron un contenido de AVB en el intervalo de 10 a 45 mg en 10 onzas de la bebida. Posteriormente H.B.S. Conacher¹⁷ revisó este método y realizó un estudio colaborativo sobre la determinación por cromatografía de gases de aceite bromado de ajonjolí en bebidas de naranja. Los resultados del estudio colaborativo señalan recuperaciones de 94.6, 95.3 y 96.0% para refrescos conteniendo 3.1, 5.22 y 10.66 mg/10 onzas de bebida respectivamente, con los correspondientes valores de desviación estándar de 0.4, 0.46 y 0.64. En base a este estudio se desarrolló el primer método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC).

James F. Lawrence, Rajinder K. Chadha y H.B.S. Conacher¹⁸ modificaron el método previamente descrito proponiendo un método alternativo de esterificación. Estos investigadores

transesterificaron los AVB mediante una metanolisis ácida, procedimiento que involucra reactivos mas fáciles de manejar que los del método oficial. Además de la simplificación del método, se obtiene un cromatograma con picos simples para el DBEM, el TBEM y el HBEM; por el contrario, con la técnica del metóxido de sodio el cromatograma obtenido es complejo, mostrando mezclas de picos para el TBEM y el HBEM.

En los trabajos basados en la técnica de cromatografía de gases que han sido descritos, se utilizaron columnas de tipo empacadas. Rajinder K. Chadha, James F. Lawrence y H.B.S. Conacher¹⁹ probaron una columna de tipo capilar, conservando el procedimiento de transesterificación vía metanolisis ácida desarrollado por ellos mismos. Su principal logro fue la detección del HBEM, analito que con las columnas empacadas era difícil de detectar y no se obtenían resultados reproducibles.

También se describe en la literatura un método que utiliza espectrometría de fluorescencia de rayos-X para la detección y estimación semicuantitativa de AVB en refrescos. El método fue desarrollado por H.B.S. Conacher, J.C. Meranger y J. Leroux²⁰ con el objetivo de contar con una técnica rápida de análisis que pudiera

utilizarse de manera previa al análisis por cromatografía de gases y así facilitar el trabajo en el caso de tener un número elevado de muestras.

Finalmente se mencionará la contribución de James F. Lawrence, Rajinder K. Chadha y H.B.S. Conacher¹¹. Ellos emplearon un método de cromatografía de líquidos en fase normal y en fase reversa para la caracterización de aceites vegetales bromados. Su principal objetivo fue la caracterización de diferentes aceites comerciales y preparados en el laboratorio. Ellos estudiaron los aceites de oliva, ajonjolí, maíz, algodón y soya, y el procedimiento que siguieron se describe brevemente a continuación.

La muestra de aceite es transesterificada mediante una metanolisis ácida y el producto obtenido se extrae con hexano. Después de llevar a sequedad la fase orgánica, el residuo se disuelve en acetonitrilo-THF para la cromatografía en fase reversa y en hexano para la cromatografía en fase normal. Para la técnica en fase reversa se utilizó una columna Ultrasphere ODS de 25 cm x 4.6 mm, de 5 μ , y una fase móvil de acetonitrilo-agua, 95:5. Para la técnica en fase normal emplearon una columna Ultrasphere Si de las mismas dimensiones que la anterior y una fase móvil consistente

en hexano-isopropanol, 500:1. En ambos casos se utilizó detección UV a 220 nm. Los autores utilizaron la relación de TBEM a DBEM así como la presencia o ausencia del HBEM para identificar el aceite involucrado, reportando que sus resultados coinciden con los obtenidos mediante la técnica de cromatografía de gases. No aplicaron esta técnica al análisis de refrescos.

De los métodos indicados, solamente los métodos cromatográficos son capaces de diferenciar e identificar los diferentes compuestos bromados individualmente lo cuál representa una ventaja. Sin embargo, la cromatografía de gases presenta algunos inconvenientes en lo que respecta a la posibilidad de descomposición de los compuestos bajo análisis; diversos autores, como Landowne y Lipsky²¹, Koehler et al.²² y H.B.S. Conacher²³ han encontrado evidencias de dicha descomposición. Por otra parte, se dificulta la detección del HBEM, a menos que se utilice una columna capilar. Por lo tanto, la cromatografía de líquidos se convierte en una posibilidad más interesante, que sin embargo no ha sido ampliamente explotada.

Así surge nuestro interés por el tema que se desarrolló en el presente trabajo de investigación y cuyos objetivos se describen a

continuación.

1.5 Objetivos del Trabajo

1.5.1 Objetivo General

Desarrollar un método analítico, utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar aceites vegetales bromados en refrescos.

1.5.2 Objetivos Específicos

1.- Caracterización mediante una técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución de los productos obtenidos en una reacción de bromación de un aceite vegetal. Para lograr este objetivo, los aceites vegetales serán transesterificados, por lo que los productos a caracterizar serán los correspondientes ésteres.

2.- Evaluación de un sistema de extracción en fase sólida para la recuperación de los ésteres metílicos que son producto de la transesterificación a la que serán sometidos los aceites vegetales bromados.

3.- Evaluación de un sistema de extracción en fase sólida

para la recuperación del aceite vegetal bromado contenido en un refresco.

4.- Aplicar el método de análisis desarrollado, a algún refresco de la localidad.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y Equipo

2.1.1 Reactivos

2.1.1.1 Solventes.

Se utilizaron éter etílico, hexano y metanol grado analítico de Productos Químicos Monterrey. El metanol fue secado con sulfato de sodio anhidro (CTR). Para los análisis cromatográficos se utilizaron los siguientes solventes grado cromatográfico: acetonitrilo (Mallinckrodt y Fisher Scientific), THF (Merck) y agua (Merck).

En diferentes etapas del trabajo experimental se utilizó un solvente compuesto de acetonitrilo y THF en proporción 4:1, el cual será denominado "solvente A".

2.1.1.2 Ésteres Metílicos.

Para ser utilizados como estándares en la caracterización de los aceites vegetales, y para la preparación de los correspondientes derivados bromados necesarios para el análisis de los AVB, fueron adquiridos de Aldrich los siguientes reactivos: oleato, linoleato, linolenato, estearato y palmitato de metilo. Para la preparación del estándar interno se adquirió de Sigma el heptadecenoato de metilo.

2.1.1.3 Derivados Bromados de los Ésteres Metílicos.

Los ésteres metílicos fueron bromados de acuerdo al procedimiento descrito a continuación.

2.1.1.3.1 Oleato de Metilo. Se disolvieron 500 mg del oleato de metilo en 15 mL de éter etílico en un matraz de reacción de 25 mL y la solución se llevó a 0°C mediante la inmersión del matraz en un baño de agua-hielo-sal. Manteniendo dicha temperatura, y bajo agitación magnética constante, se dosificaron 0.15 mL de bromo durante un período de 20 minutos. Terminada la dosificación se mantuvo la agitación a 0°C por 10 minutos más. Posteriormente la solución se transfirió, añadiendo 15 mL adicionales de éter, a un embudo de separación que contenía 50

mL de solución de tiosulfato de sodio al 10%. Se agitó y después se permitió la separación de capas para posteriormente descartar la fase acuosa; la fase etérea por su parte se lavó con dos porciones de 10 mL de agua y se secó con sulfato de sodio anhidro. El éter se eliminó bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente.

2.1.1.3.2 Linoleato, Linolenato y Heptadecenoato de Metilo. El resto de los ésteres metílicos fueron bromados siguiendo el mismo procedimiento descrito, excepto que para el linoleato de metilo se utilizaron 0.30 mL de bromo y para el linolenato de metilo 0.45 mL de dicho reactivo. En esta última reacción, la bromación del linolenato de metilo, se obtuvieron dos productos: uno soluble en el medio de reacción (denominado HBEM soluble) y otro que precipitó (denominado HBEM insoluble).

2.1.1.4 Aceites Vegetales y sus Derivados Bromados.

Los aceites vegetales de maíz y de soya utilizados en este estudio fueron adquiridos en casas comerciales de la localidad. Sus derivados bromados fueron preparados en el laboratorio siguiendo el mismo procedimiento descrito para la bromación de los ésteres metílicos pero utilizando 0.2 y 0.3 mL de bromo respectivamente.

También se utilizó en este trabajo una muestra de un aceite

bromado comercial de la compañía Haarmann & Reimer. Se trata de un aceite bromado de maíz.

2.1.1.5 Solución Ácida de Metanol.

Se disolvieron 2 mL de ácido sulfúrico grado reactivo (Desarrollo de Especialidades Químicas) en metanol y se aforó a 100 mL con metanol.

2.1.1.6 Refrescos.

Para el desarrollo del método de tratamiento de muestra se utilizó un refresco de uva de la marca 10-K (producto importado). Por otra parte, el método de análisis propuesto en este trabajo se probó en un refresco de toronja de la marca Joya (producto de la localidad). La composición de ambos refrescos se reporta en la tabla II.

2.1.2 Equipo

2.1.2.1 Sistema de Extracción en Fase Sólida.

En dos etapas del método de análisis desarrollado en este estudio se utilizó un procedimiento de extracción en fase sólida. En ambos casos se emplearon cartuchos empacados con 500 mg de fase C-18 (Supelclean LC-18 de Supelco) de 6 mL de capacidad. El

sistema de extracción seleccionado fue el de presión positiva de una línea de nitrógeno (figura 2); se utilizó nitrógeno grado cromatográfico (INFRA).

TABLA II
COMPOSICIÓN DE LOS REFRESCOS EMPLEADOS

REFRESCO	COMPOSICIÓN
Refresco 10-K sabor uva	Agua, azúcar, fructosa de jarabe de maíz, ácido cítrico, benzoato de sodio, sorbato de potasio, citrato de sodio y de potasio, sal, sabor natural, fosfato de sodio y color caramelo.
Refresco Joya sabor toronja	Agua carbonatada, azúcar de caña, ácido cítrico, saborizantes naturales y artificiales, almidón modificado, aceite vegetal bromado y benzoato de sodio.

2.1.2.2 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos modelo 5000 de Varian equipado con un detector de arreglo de diodos modelo Polychrom 9065 (figura 3). Para el control del detector así como el manejo de la información resultante del análisis cromatográfico se utilizó el software Star Chromatography versión 4 de Varian instalado en una computadora HP modelo Vectra VL2.

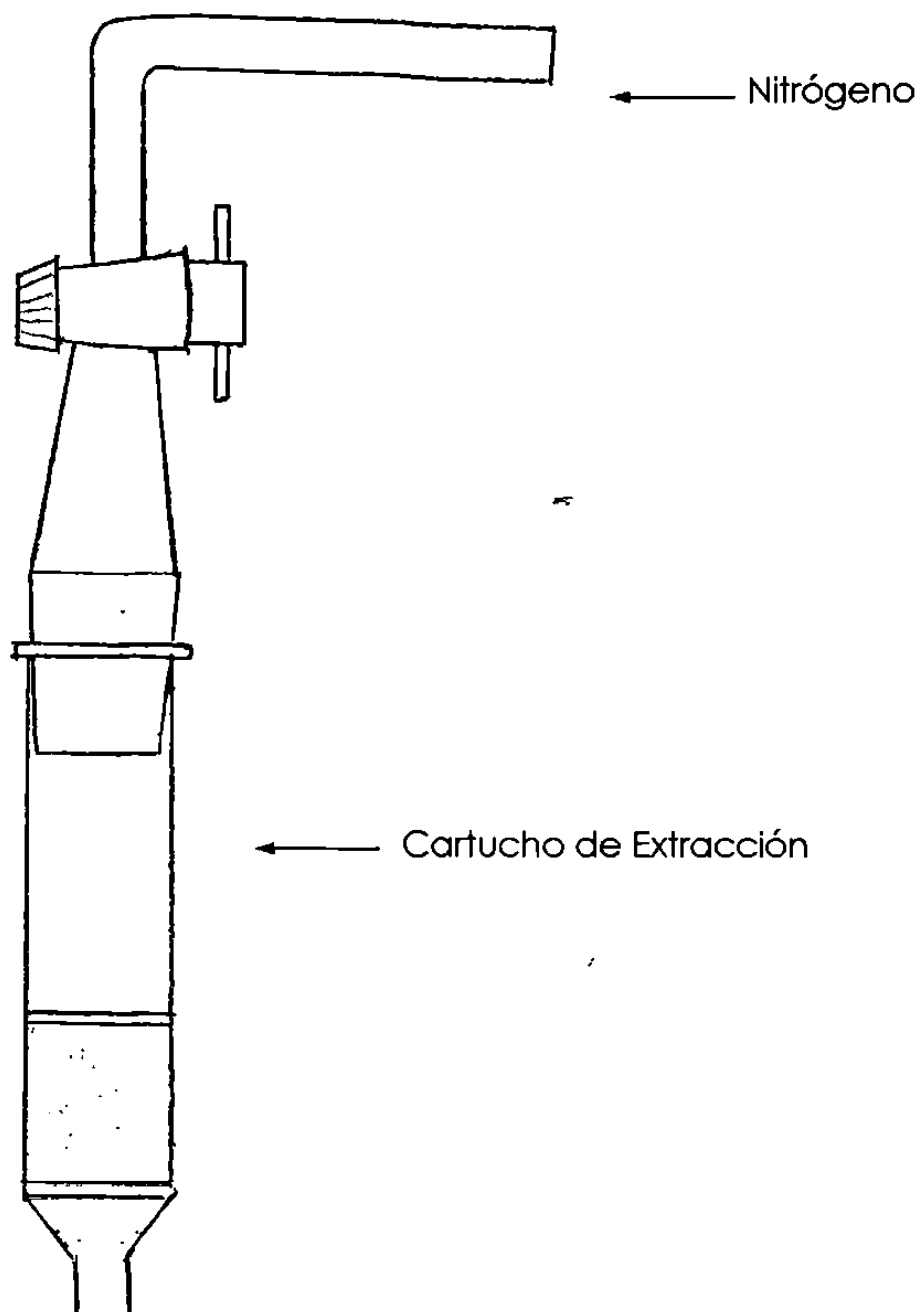


Figura 2. Sistema de Extracción en Fase Sólida.



Figura 3. Cromatógrafo de Líquidos.

Se empleó una columna de fase octadecil silano enlazada (Supelcosil LC-18 de Supelco) con las siguientes características: 25 cm de largo, 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm . También se utilizó una columna de guardia de 2 cm de longitud (Supelguard LC-18).

El volumen de inyección fue de 10 μL y la velocidad de flujo de 1 mL/min. Los eluentes utilizados fueron desgasificados utilizando helio grado cromatográfico, (INFRA). Todas las muestras fueron filtradas, previamente a su inyección, con filtros de jeringa de 25 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro (Iso-disc P-254 de Supelco).

2.2 Caracterización por CLAR de los Ésteres Metílicos y de sus Derivados Bromados

2.2.1 Introducción

Para la caracterización por CLAR de los AVB estos serán sometidos a una reacción de transesterificación para liberar los correspondientes ésteres, es decir, los derivados bromados del oleato y linoleato de metilo en el caso del aceite de maíz, y además el del linolenato de metilo en el caso del aceite de soya.

Por otra parte, se debe tomar en cuenta que si el aceite no estuviera por completo bromado también cabría esperar la formación de uno o varios de los siguientes compuestos: oleato, linoleato y linolenato de metilo. Adicionalmente, también se deben considerar los ésteres provenientes de la porción saturada del aceite, que para los aceites estudiados son el palmitato y el estearato de metilo.

Tomando en cuenta lo anterior, si se pretende caracterizar los AVB por CLAR, se debe desarrollar un método cromatográfico que permita la resolución de todos los analitos indicados, incluido el que será utilizado como estándar interno, es decir, el dibromoheptadecanoato de metilo (DBHM).

2.2.2 Desarrollo del Método Cromatográfico de Análisis por CLAR

Se prepararon soluciones de los ésteres metílicos y de sus productos de bromación en el solvente A (pp. 17). En la tabla III se muestra la composición de cada una de las soluciones preparadas; cabe señalar que las concentraciones utilizadas se seleccionaron de forma que la altura de todos los picos fuera semejante y así poder observarlos todos simultáneamente al analizar una mezcla de los analitos.

Considerando que se debían resolver 10 compuestos, y que uno de ellos da dos picos (el TBEM), se tuvieron serias dificultades en el desarrollo de un método cromatográfico eficaz; sin embargo, finalmente se lograron resultados aceptables con dos métodos que serán llamados en este trabajo "método isocrático" y "método gradiente" y que a continuación se describen.

TABLA III
COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES ANALIZADAS

ANALITO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)
Oleato de metilo	0.94
Linoleato de metilo	0.20
Linolenato de metilo	0.1
Estearato de metilo	10.1
Palmitato de metilo	10.4
Heptadecenoato de metilo	10.0
DBEM	1.1
TBEM	2.54
DBHM	1.2
HBEM soluble	8.30
HBEM insoluble	2.86

1) Método isocrático: En este método se utiliza como eluente acetonitrilo. La longitud de onda de detección óptima para los analitos insaturados es de 195 nm y para los analitos saturados es de 210 nm; en el caso de los analitos bromados es de

205 nm. Las soluciones indicadas en la tabla III y el solvente A, fueron analizados siguiendo éste método.

2) Método gradiente: En este método se utiliza como eluente una mezcla de los solventes acetonitrilo y agua. La composición del eluente se modifica de acuerdo a un gradiente por etapas, mismo que se describe a continuación.

En la primera etapa, la cual tiene una duración de 17 minutos, se trabaja con un 91% de acetonitrilo. Posteriormente se cambia la composición del eluente a 100% acetonitrilo en dos minutos y así se mantiene el tiempo restante de la corrida cromatográfica. Una vez terminado el análisis, para preparar de nuevo el sistema para la siguiente inyección, se cambia la composición del eluente a 91% de acetonitrilo en 5 minutos.

Las mismas soluciones que se analizaron bajo el método isocrático, fueron analizadas bajo las condiciones de este método gradiente.

2.3 Elaboración de Curvas de Calibración

Considerando que el objetivo primordial de este estudio es la cuantificación de AVB, y que esta se realizará a través de la

cuantificación de sus correspondientes ésteres metílicos, es necesario contar con curvas de calibración para cada uno de ellos. Por lo tanto se procedió a la elaboración de curvas de calibración para el DBEM, TBEM, HBEM soluble y HBEM insoluble.

Se preparó una solución stock en el solvente A de los analitos de interés; su composición se reporta en la tabla IV. Además se preparó una solución, en el mismo solvente, del estándar interno, con una concentración de 12.74 mg/mL.

TABLA IV
COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE
ÉSTERES METÍLICOS BROMADOS

ANALITO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)
DBEM	0.824
TBEM	1.13
HBEM soluble	0.16
HBEM insoluble	0.15

A partir de la solución stock se hicieron 4 diluciones para preparar las soluciones empleadas en la elaboración de la curva de calibración. A cada solución se le agregaron 100 μ L de la solución de DBHM. La composición de las soluciones resultantes se reporta en la tabla V.

Las 4 soluciones fueron analizadas por CLAR siguiendo los dos métodos cromatográficos desarrollados. Cada solución se inyectó tres veces bajo las condiciones de cada uno de los métodos.

TABLA V

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

SOL'N No.	DBEM (mg/mL)	TBEM (mg/mL)	HBEM SOL. (mg/mL)	HBEM INS. (mg/mL)	DBHM (mg/mL)
1	0.659	0.902	0.12	0.12	0.254
2	0.330	0.451	0.062	0.061	0.254
3	0.165	0.226	0.031	0.030	0.254
4	0.0824	0.113	0.016	0.015	0.254

2.4 Caracterización por CLAR de AVB

2.4.1 Transesterificación de los Aceites Vegetales y de sus Derivados Bromados

Para transesterificar los aceites vegetales y sus derivados bromados se seleccionó el método de metanólisis ácida desarrollado por J. Lawrence, Rajinder K. y H.B.S. Conacher¹⁸ pero modificado en lo que concierne a la extracción de los ésteres metílicos al final de la reacción.

En seguida se describen los procedimientos de transesterificación y de extracción utilizados

2.4.1.1 Procedimiento de Transesterificación.

La muestra a transesterificar se colocó en un matraz de reacción de 100 mL y se le agregó 100 μ L de la solución de DBHM (estándar interno). El solvente de la muestra y de la solución del estándar interno se eliminó bajo corriente de nitrógeno.

Posteriormente se agregaron 25 mL de la solución ácida de metanol y se calentó a reflujo (63°C) bajo agitación magnética constante. El reflujo se mantuvo por una hora al término de la cual la mezcla de reacción se enfrió y se le añadió 40 mL de agua.

Cabe señalar que para evaluar este procedimiento de transesterificación se preparó una solución de aceite de soya en el solvente A, y fue analizada, sin transesterificar, utilizando el método isocrático. El resultado obtenido se comparó con el de una muestra del mismo aceite que sí se sometió a este tratamiento de transesterificación

2.4.1.2 Procedimiento de Extracción de los Esteres Metílicos.

Se utilizó un procedimiento de extracción en fase sólida. El

cartucho se acondicionó con 3 mL de metanol seguidos por 5 mL de agua a pH 3.

Después del acondicionamiento se hizo pasar la mezcla de reacción por el cartucho a un flujo de 2.5 mL/min, y al finalizar esta, se pasaron 5 mL de agua. Antes de proceder a la elución de los analitos retenidos en el cartucho, este se secó con la ayuda del flujo de nitrógeno.

Los ésteres metílicos fueron eluidos con 10 mL de hexano, utilizándose un flujo de 1 mL/min. El hexano se secó con sulfato de sodio anhidro y después de filtrarlo se eliminó bajo corriente de nitrógeno y el residuo se recuperó con 3 mL de solvente A.

Para evaluar este procedimiento de extracción se preparó una solución, en el solvente A, con los derivados bromados estándar. La composición de esa solución se reporta en la tabla VI. Dicha solución se sometió al procedimiento de transesterificación y al de extracción previamente descrito, por triplicado. En cada caso se utilizó una alícuota de 1 mL. La solución obtenida al final se analizó por CLAR utilizando el método isocrático. Para determinar los porcentajes de recuperación de los diferentes analitos, se aprovecharon las curvas de calibración cuya elaboración se

describió en la sección 2.3. Los resultados de esta evaluación se presentan en el capítulo 3.

TABLA VI

COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN UTILIZADA PARA LA EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

ANALITO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)
DBEM	1.04
TBEM	1.78
HBEM soluble	0.19
HBEM insoluble	0.16

2.4.2 Análisis de los Aceites Vegetales y de sus Derivados Bromados

Finalmente, una vez evaluados los procedimientos de transesterificación y de extracción descritos, con los estándares, se procedió a trabajar con los aceites vegetales y sus derivados bromados.

Uno de los objetivos de esta etapa era la caracterización de los AVB y para ello se trabajó con el aceite de maíz y con el de soya y con sus respectivos productos de bromación. El aceite bromado de Haarmann & Reimer también se sometió a este

tratamiento de transesterificación En cada caso se trabajó con 3 mg de muestra y la solución obtenida, después de la extracción de los ésteres metílicos, fue analizada por CLAR utilizando el método isocrático o el método gradiente, según fuera necesario.

Por otra parte, también se evaluó la composición del aceite de soya bromado ya que este fue utilizado para la evaluación del tratamiento de muestra. Para lograr este objetivo, se sometió el aceite al procedimiento de transesterificación descrito y la solución resultante se analizó por CLAR utilizando el método isocrático; los analitos correspondientes fueron cuantificados. Este procedimiento se hizo por triplicado empleando en cada caso 3 mg de muestra.

2.5 Tratamiento de la Muestra

2.5.1 Introducción

Un punto muy importante en el desarrollo de un método de análisis es el tratamiento de la muestra. En este caso, los AVB que se pretenden analizar se encuentran dispersos en un refresco por lo que es necesario contar con un método de extracción de los mismos. El método oficial de análisis de los AVB utiliza una extracción con éter etílico pero en este trabajo se propone un

procedimiento de extracción en fase sólida.

Para la evaluación de dicho procedimiento de extracción se preparó, en primer lugar, una muestra de composición semejante a la de un refresco y con una cantidad conocida de AVB. Posteriormente se probó en dicha muestra el método de extracción propuesto; el extracto obtenido fue transesterificado y el producto cuantificado por CLAR para poder calcular el porcentaje de recuperación.

A continuación se describen brevemente las diferentes etapas mencionadas.

2.5.2 Preparación de la muestra

Para lograr tener una matriz lo mas semejante posible a la de los refrescos que serían analizados con el método propuesto, se decidió utilizar, precisamente, un refresco que no contuviera AVB. El refresco elegido fue uno de sabor uva de la marca 10-K.

Se decidió preparar la muestra con 15 ppm del AVB, que es la concentración máxima permitida para dichos compuestos en un refresco. Se seleccionó el AVB de soya para esta evaluación porque es el que contiene todos los analitos bromados de interés.

No fue fácil la dispersión del aceite en el refresco y los primeros intentos resultaron en porcentajes de recuperación muy bajos. Sin embargo, resultaba aparente que el problema era la deficiente dispersión del AVB y no el procedimiento de extracción. Después de evaluar diversas maneras se encontró que el procedimiento de dispersión mas efectivo consistía en utilizar una solución al 15% del solvente A en el refresco. Primero se disolvió el aceite bromado en el solvente y luego se agregó el refresco. Procediendo de esa forma se evaluó también una muestra con 10% de solvente A.

2.5.3 Extracción del AVB del Refresco

Se utilizó un procedimiento de extracción en fase sólida. El cartucho se acondicionó con 3 mL de metanol y 5 mL de agua. Posteriormente se hicieron pasar 200 mL de la muestra de refresco a tratar, mezclados con 100 μ L de la solución de DBHM, a un flujo de 2.5 mL/min. Después de pasar la muestra el cartucho se lavó con 5 mL de agua y se secó bajo el flujo de nitrógeno. El contenido del cartucho fue eluído con 10 mL de hexano (flujo de 1 mL/min). La solución obtenida se secó con sulfato de sodio y después de filtrar se transfirió al matraz donde se efectuaría la transesteri-

ficación.

2.5.4 Transesterificación y Recuperación de los Ésteres Metílicos

Para llevar a cabo la transesterificación se eliminó el hexano de la solución obtenida de la extracción previamente descrita. El residuo se sometió al procedimiento de transesterificación descrito en la sección 2.4.1.1 a partir del punto dónde se agrega la solución ácida de metanol. Al término de la reacción de transesterificación los ésteres metílicos obtenidos se recuperaron siguiendo el procedimiento de extracción descrito en la sección 2.4.1.2.

2.5.5 Análisis por CLAR

Finalmente, la solución obtenida se analizó por CLAR utilizando el método isocrático.

Cabe señalar que tanto la muestra preparada con 10% de solvente como la que se hizo con 15% fueron sometidas a todo este tratamiento de muestra por duplicado.

2.6 Análisis de un Refresco

El refresco seleccionado para ser analizado fue uno de

sabor toronja de la marca Joya cuya etiqueta de composición indicaba la presencia de aceite vegetal bromado.

El refresco se sometió al tratamiento de muestra descrito en la sección 2.5 agregándole un 15% del solvente A. La muestra fue analizada por triplicado. En cada caso el análisis por CLAR se realizó por los dos métodos desarrollados.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización por CLAR de los Ésteres Metílicos y de sus Derivados Bromados

3.1.1 Análisis Cromatográfico por el Método Isocrático

3.1.1.1 Análisis de los Ésteres Metílicos.

En las figuras 4-8 (Apéndice A, pp. 70-74) se pueden observar los cromatogramas obtenidos al analizar los ésteres metílicos bajo las condiciones del método isocrático. Por otra parte, en las figuras 9-13 (Apéndice B, pp. 91-95) se reportan los mismos cromatogramas pero en forma tridimensional para que se puedan apreciar los diferentes picos a pesar de tener diferentes máximos de absorción. Cabe señalar que el pico de tiempo de retención (t_R) 3.2 minutos que aparece en todos los cromatogramas corresponde al solvente de las muestras como se confirmó al inyectar éste bajo las mismas

condiciones (el cromatograma correspondiente se encuentra en la figura 14, Apéndice A, pp. 75).

Con este trabajo quedaron establecidos los tiempos de retención de los analitos no bromados, así como sus espectros UV, información que es necesaria para el análisis de sus derivados bromados.

Observamos que el tiempo de retención se incrementa a medida que disminuye el grado de insaturación. En lo que concierne a la resolución de estos componentes, los resultados obtenidos muestran que los únicos picos que se traslaparían son los correspondientes al oleato y palmitato de metilo. No se hizo ningún intento de resolverlos ya que dichos analitos no serían cuantificados.

3.1.1.2 Análisis de los Ésteres Metílicos Bromados.

En la literatura se reporta²⁴ que al llevar a cabo la reacción de bromación de aceites vegetales se forman simultáneamente productos de adición y de deshidrobromación y por ello en este trabajo era interesante determinar el número de derivados bromados formados al bromar los ésteres metílicos. Por supuesto que esto queda sujeto a que dichos derivados sean detectables

mediante el análisis cromatográfico utilizado. En las figuras 15-18 (Apéndice A, pp. 76-79) se presentan los cromatogramas, obtenidos bajo las condiciones del método isocrático, para cada producto bromado. Por otra parte, en las figuras 19-22 (Apéndice B, pp. 96-99) se reportan los mismos cromatogramas pero en forma tridimensional para que se aprecien los diferentes picos a pesar de tener diferentes máximos de absorción.

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los productos de bromación.

3.1.1.2.1 Oleato de Metilo Bromado. Al comparar las figuras 4 y 15 (Apéndice A, pp. 70 y 76) observamos los diferentes tiempos de retención obtenidos, en un caso para el oleato de metilo, y en otro para su producto bromado y en la figura 23 (Apéndice C, pp. 102) se aprecia la diferencia en sus espectros UV; con ambos datos se confirma que la bromación se llevó a cabo. Por otra parte, la ausencia de un pico a 11.3 minutos en el cromatograma del oleato de metilo bromado nos indica que la bromación fue completa.

En lo que concierne al número de productos obtenidos al bromar el oleato de metilo observamos en el cromatograma correspondiente un pico principal de tiempo de retención de 9.7

minutos; ese pico debe corresponder al dibromoestearato de metilo que es el producto principal esperado en la reacción efectuada. Se observa además un pico de muy poca intensidad con un tiempo de retención de 8 minutos y un espectro UV diferente al del pico principal como se puede apreciar en la figura 24 (Apéndice C, pp. 103). No se determinó a que compuesto corresponde, sin embargo, es poco probable que pertenezca a un derivado bromado sin dobles enlaces C-C ya que como se verá mas adelante dichos compuestos tienen espectros muy similares entre ellos.

Cabe agregar que se determinó pureza de pico en cada caso, y en base a los índices de correlación encontrados (tabla VII), se determinó que cada uno corresponde a un solo componente.

TABLA VII

PUREZA DE PICO EN EL CROMATOGRAMA
DEL OLEATO DE METILO BROMADO

PICO	MEJOR CORRELACIÓN	PEOR CORRELACIÓN
8.0 min	0.999492	0.994062
9.7 min	0.999997	0.999985

3.1.1.2.2 Linoleato de Metilo Bromado. En el cromatograma correspondiente a este producto (figura 16, Apéndice A, pp. 77) observamos dos picos principales; a pesar de que el tiempo de retención del segundo es similar al del linoleato de metilo (figura 5, Apéndice A, pp. 71) podemos afirmar que la bromación si se llevó a cabo considerando las diferencias entre los respectivos espectros UV (figura 25, Apéndice C, pp. 104).

Por otra parte se confirma que la bromación es completa al determinar la pureza del pico de tiempo de retención de 7.9 minutos. También se analizó la pureza del pico de tiempo de retención de 7.5 minutos. En ambos casos se concluye que corresponden a un solo componente, como lo señalan los índices de correlación reportados en la tabla VIII.

TABLA VIII

PUREZA DE PICO EN EL CROMATOGRAMA
DEL LINOLENATO DE METILO BROMADO

PICO	MEJOR CORRELACIÓN	PEOR CORRELACIÓN
7.5 min	0.999996	0.999975
7.9 min	0.999983	0.999878

En lo que respecta al número de productos obtenidos ya se

ha señalado la obtención de dos componentes principales, los cuales pueden corresponder a dos isómeros del tetrabromo-estearato de metilo, como se reporta en la literatura¹¹. Sin embargo no se confirmó la identidad de dichos compuestos por algún otro método.

Además de los dos picos principales indicados, se presentan en el cromatograma una serie de picos, de muy baja intensidad, a 5.6, 6.0, 6.4 y 10.7 minutos que no parecen corresponder a derivados bromados sin insaturaciones C-C analizando sus espectros UV (figura 26, Apéndice C, pp. 105).

3.1.1.2.3 Linolenato de Metilo Bromado. Como ya se había mencionado en el capítulo anterior, al bromar el linolenato de metilo se obtienen dos productos con diferente solubilidad en el medio de reacción (denominados HBEM soluble y HBEM insoluble). Ambos fueron analizados por separado.

Al comparar los cromatogramas del linolenato de metilo y de sus derivados bromados (figuras 6, 17 y 18, Apéndice A, pp.72,78 y 79), se observa una gran similitud entre sus respectivos tiempos de retención. Sin embargo, al igual que en los casos anteriores, son las diferencias entre el espectro UV del material de partida y los

espectros UV de los derivados (figura 27, Apéndice C, pp. 106) lo que nos permite afirmar que sí se llevo a cabo la reacción de bromación.

Para verificar que la bromación fue completa se determinó pureza de pico del único pico del HBEM insoluble y del pico principal del HBEM soluble; considerando los índices de correlación encontrados (tabla IX) se concluye que ambos picos corresponden a un solo componente y por lo tanto que la bromación fue completa.

TABLA IX

PUREZA DE PICO EN LOS CROMATOGRAMAS
DEL HBEM SOLUBLE Y DEL HBEM INSOLUBLE

PICO	MEJOR CORRELACIÓN	PEOR CORRELACIÓN
HBEM ins., 6.2 min	0.999993	0.999828
HBEM sol., 6.4 min	0.999966	0.999918

Como puede observarse en el cromatograma del HBEM insoluble, dicho producto solo consta de un componente. En cambio, en el caso del HBEM soluble se obtiene un pico principal y tres de menor intensidad. Tanto el pico principal como los picos de tiempos de retención de 6.2 y 7.0 minutos presentan espectros UV

muy similares entre ellos (figura 28, Apéndice C, pp. 107) y con respecto a los de los derivados bromados de los otros ésteres; ello hace suponer que se trata de tres productos bromados sin insaturaciones C-C, al igual que el HBEM insoluble. El pico de tiempo de retención de 8.0 minutos presenta un espectro UV diferente.

En base a lo anterior se tendrían 4 productos principales derivados de la bromación del linolenato de metilo. Lawrence, Chadha y Conacher¹¹, solo reportan la obtención de dos isómeros, de diferente solubilidad, coincidiendo con éste trabajo en que el isómero más insoluble eluye primero en el sistema cromatográfico.

3.1.1.3 Análisis del Estándar Interno.

En las figuras 29 y 30 (Apéndice A, pp. 80 y 81) se reportan los cromatogramas obtenidos, bajo las condiciones del método isocrático, para el heptadecenoato de metilo y para su derivado bromado (DBHM) respectivamente. Al comparar los tiempos de retención de ambos productos y sus respectivos espectros UV (figura 31, Apéndice C, pp. 108) se confirma que la bromación se llevó a cabo. Por otra parte la ausencia del pico de tiempo de retención de 9.2 minutos en el cromatograma del producto

bromado indica que la bromación fue completa.

En la figura 32 (Apéndice B, pp.100) se reporta el cromatograma del DBHM de forma tridimensional y ahí se puede comprobar que solo se obtiene un pico. Además, el análisis de pureza de pico del mismo nos indica que se trata de un solo componente (mejor correlación = 0.999968, peor correlación = 0.998945).

3.1.1.4 Análisis de Mezcla de Analitos.

En la tabla X se resumen los tiempos de retención y los factores de capacidad que se obtuvieron, bajo las condiciones del método isocrático, para todos los analitos estudiados. Cabe hacer la aclaración que en el caso del TBEM se consideraron los dos picos principales y en el caso del HBEM soluble solo se consideró el pico principal.

Por otra parte, para el cálculo del factor de capacidad se consideró un tiempo muerto (t_0) de 3.2 minutos; este tiempo corresponde al obtenido para el solvente de la muestra y fue corroborado mediante la inyección de una solución de uracil, siendo este compuesto un trazador recomendado en la literatura sobre el tema²⁵.

TABLA X

TIEMPOS DE RETENCIÓN Y FACTORES DE CAPACIDAD DE LOS ANALITOS BAJO ESTUDIO (MÉTODO ISOCRÁTICO)

ANALITO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	FACTOR DE CAPACIDAD†
Oleato de metilo	11.4	2.5
Linoleato de metilo	8.2	1.6
Linolenato de metilo	6.4	1.0
Palmitato de metilo	11.6	2.6
Estearato de metilo	17.2	4.4
DBEM	9.7	2.0
TBEM (1° pico)	7.5	1.3
TBEM (2° pico)	7.9	1.5
HBEM sol.	6.4	1.0
HBEM ins.	6.2	0.9
DBHM	8.1	1.5

† Factor de capacidad = $(t_R - t_0) / t_0$

Del análisis de la información presentada en la tabla X se puede predecir que se tendrán problemas de resolución, por una parte, entre los picos del DBHM, del linoleato de metilo y del TBEM, y por otra, entre los picos del linolenato de metilo y sus derivados bromadost. Para corroborar lo anterior se inyectó una mezcla de todos los analitos, utilizando las condiciones del método isocrático. El cromatograma resultante se muestra en la figura 33 (Apéndice A,

† También se traslaparían los picos del oleato y del palmitato de metilo pero, como ya se había señalado, dichos analitos no serán cuantificados y por eso no es necesaria su completa resolución.

pp. 82) confirmándose las predicciones. Como se observa, si la muestra a analizar está por completo bromada no se tendrían problemas con el uso de este método cromatográfico; incluso, si la muestra contiene restos de compuestos insaturados sin bromar, aún es posible utilizar el método isocrático siempre y cuando se utilice como longitud de onda de detección 220 nm y se esté dispuesto a perder sensibilidad. En efecto, a dicha longitud de onda los compuestos insaturados disminuyen su absorción en mayor grado que los derivados bromados como puede comprobarse al analizar la figura 34 (Apéndice C, pp. 109); en dicha figura se comparan los espectros UV de un compuesto insaturado y de un derivado bromado. Por otra parte en la figura 35 (Apéndice A, pp. 83) se reporta el cromatograma de la mezcla de analitos a una longitud de onda de 220 nm.

3.1.2 Análisis Cromatográfico por el Método Gradiente

Para lograr la resolución de todos los analitos se utilizó como eluyente una mezcla de agua y acetonitrilo. Después de probar diversas composiciones de fase móvil se llegó a la conclusión de que con un 9% de agua se lograban los mejores resultados. Es decir, se obtenían los picos de linolenato de metilo, HBEM soluble,

HBEM insoluble y linoleato de metilo completamente resueltos y parcialmente resueltos los picos del TBEM y del DBHM.

El siguiente paso fue intentar un gradiente para tratar de mejorar la resolución de los picos del TBEM y del DBHM, y disminuir los tiempos de retención de los diferentes analitos. Los mejores resultados se obtuvieron con el método descrito en el capítulo 2 y que fue denominado "método gradiente". Aunque no se logró una completa resolución de los picos mencionados, ésta mejoró, pasando de un valor de 0.9 a 1.2 entre el primer pico del TBEM y el pico del DBHM; el segundo pico del TBEM se obtiene como pico cola del DBHM en todos los casos.

En las figura 36-45 (Apéndice D, pp. 111-120) se reportan los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones de este método cromatográfico para cada uno de los analitos estudiados y en la tabla XI se resumen los tiempos de retención y los factores de capacidad de todos ellos. El cromatograma obtenido para la mezcla de analitos bajo estas condiciones cromatográficas se puede apreciar en la figura 46 (Apéndice D, pp.121). En base a estos resultados se concluye que si el aceite no está por completo bromado es preferible utilizar este método cromatográfico.

En lo que respecta al tiempo de análisis éste se logró acortar con el método desarrollado, como puede observarse en la figura 47 (Apéndice D, pp.122). En dicha figura se comparan los cromatogramas obtenidos para el DBEM bajo las siguientes condiciones: elución isocrática con el eluyente acetonitrilo:agua, 91:9, y elución bajo las condiciones del método gradiente; se puede observar que además de lograr tiempos de análisis más cortos se logran picos más angostos lo que repercutirá en una mayor sensibilidad.

TABLA XI

TIEMPOS DE RETENCIÓN Y FACTORES DE CAPACIDAD DE LOS ANALITOS BAJO ESTUDIO (MÉTODO GRADIENTE)

ANALITO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	FACTOR DE CAPACIDAD
Oleato de metilo	26.6	7.3
Linoleato de metilo	19.1	5.0
Linolenato de metilo	12.5	2.9
Palmitato de metilo	26.8	7.4
Estearato de metilo	31.8	8.9
DBEM	24.7	6.7
TBEM (1° pico)	19.5	5.1
TBEM (2° pico)	20.6	5.4
HBEM sol.	15.9	4.0
HBEM ins.	15.0	3.7
DBHM	20.4	5.4

3.2 Elaboración de Curvas de Calibración

Para cuantificar los analitos de interés se utilizó un método de estándar interno y se trabajó en base a las alturas de pico. En las figuras 48-51 (Apéndice E, pp. 129-132) se reportan las curvas de calibración, promedio de tres réplicas, para cada uno de los analitos que se cuantificaron, por el método isocrático; por otra parte, en las figuras 52-55 (Apéndice E, pp. 132-136) se muestran las curvas correspondientes para el método gradiente. Cabe aclarar que los dos compuestos de HBEM obtenidos se cuantificaron por separado y que en el caso del TBEM se sumaron las alturas de los dos picos obtenidos.

En cada figura se muestra, además, la línea de regresión de y en x obtenida y el cuadrado del coeficiente de correlación resultante. Así mismo se reporta en cada gráfica la ecuación de la línea de regresión.

Como puede observarse, los valores de correlación obtenidos nos indican que la respuesta de nuestro sistema cromatográfico es lineal en el intervalo de concentraciones evaluado para cada analito, mismo que se reporta en la tabla XII. En dicha tabla también se incluyen los intervalos de concentración

esperados para cada analito; esos valores se calcularon considerando que la concentración del aceite bromado en el refresco sea de 15 ppm y tomando en cuenta la composición típica de los aceites de maíz y de soya (tabla I, pp. 6).

TABLA XII
INTERVALO DE CONCENTRACIÓN EVALUADO
Y ESPERADO PARA CADA ANALITO

ANALITO	INTERVALO DE Conc. EVALUADO (mg/mL)	INTERVALO DE Conc. ESPERADO (mg/mL)
HBEM Soluble	0.016 - 0.12	0.03 - 0.08
HBEM Insoluble	0.015 - 0.12	0.03 - 0.08
TBEM	0.113 - 0.902	0.4 - 0.7
DBEM	0.0824 - 0.659	0.1 - 0.5

En las figura 56 (Apéndice A, pp. 84) y en la figura 57 (Apéndice D, pp. 123) se muestran cromatogramas típicos obtenidos en cada método cromatográfico.

3.3 Caracterización por CLAR de AVB

3.3.1 Transesterificación de Aceites Vegetales y de sus Derivados Bromados

Al comparar en la figura 58 (Apéndice A, pp. 85) los cromatogramas

togramas obtenidos para el aceite de soya antes y después de ser transesterificado confirmamos que la reacción se llevó a cabo; efectivamente, observamos la desaparición de los picos correspondientes al aceite y la aparición de los picos relacionados con sus derivados metílicos.

Por otra parte, en lo que concierne a la evaluación del procedimiento de extracción se obtuvieron los siguientes resultados. En la tabla XIII se reportan el porcentaje de recuperación promedio de cada analito así como el coeficiente de variación en por ciento (% C.V.) correspondiente. Observamos que los porcentajes de recuperación son buenos aunque podrían mejorarse y que el coeficiente de variación se encuentra dentro del valor esperado tomando en cuenta el nivel de concentración que se está manejando para los analitos.

TABLA XIII

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN POSTERIOR A LA TRANSESTERIFICACIÓN

ANALITO	% DE RECUPERACIÓN	% C.V. †
DBEM	85.4	3.8
TBEM	86.5	13.5
HBEM Soluble	78	18.6
HBEM Insoluble	82	7.4

† % C.V. = (Desviación Estándar x 100) / Valor Promedio

3.3.2 Análisis de los Aceites Vegetales y de sus Derivados Bromados

Al analizar los cromatogramas correspondientes a los aceites vegetales de soya y de maíz transesterificados (figuras 59 y 60, Apéndice A, pp. 86 y 87) se pueden identificar, por sus tiempos de retención y sus espectros UV, los componentes esperados: oleato, linoleato y linolenato de metilo. En realidad no se esperaba detectar el linolenato de metilo en el caso del aceite de maíz ya que su porcentaje en el mismo suele ser muy bajo; sin embargo se puede observar en el cromatograma correspondiente un pico que coincide tanto en tiempo de retención como en espectro UV con el del linolenato de metilo.

En lo que respecta a los componentes saturados, es decir, palmitato y estearato de metilo, estos no fueron detectados tal vez debido a su bajo factor de respuesta.

En el cromatograma del aceite de maíz bromado y transesterificado (figura 61, Apéndice D, pp. 124) se pueden identificar los picos correspondientes al TBEM y al DBEM; no se observan los picos del HBEM debido posiblemente a la baja concentración del linolenato de metilo en el aceite de maíz

original. Por otra parte, la ausencia de los picos del oleato y del linoleato de metilo nos indica que la bromación fue completa.

En lo que concierne al aceite de soya bromado se pudieron identificar, en su producto transesterificado, los picos correspondientes al HBEM, TBEM y DBEM (figura 62, Apéndice D, pp. 125); al igual que en el caso anterior la ausencia de los picos de linolenato, linoleato y oleato de metilo señalan que la bromación fue completa.

La composición del aceite de soya fué evaluada y los resultados obtenidos se reportan en la tabla XIV; se indica el porcentaje promedio de cada analito así como el coeficiente de variación en porciento correspondiente en cada caso. Los valores encontrados dependen de la composición del aceite de partida la cuál no fué determinada; sin embargo, a partir de datos de composición típica reportados en la literatura (tabla I, pp. 6), se pueden estimar de manera aproximada los valores esperados para los componentes bromados. Procediendo de esa forma, se observan resultados dentro del intervalo esperado para el HBEM y un poco más bajos para el DBEM y TBEM. En la figura 63 (Apéndice A, pp. 88) se puede observar un cromatograma típico de este análisis.

TABLA XIV
COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE SOYA BROMADO

ANALITO	% PROMEDIO	% C.V.
HBEM insoluble	3.07	4.98
HBEM soluble	5.78	4.70
TBEM	38.5	7.88
DBEM	12.6	11.28

Finalmente, en cuánto al análisis del aceite bromado comercial se obtuvieron los siguientes resultados. Como puede observarse en la figura 64 (Apéndice D, pp. 126) se pudieron detectar los picos correspondientes a los derivados bromados, DBEM y TBEM, así como los picos de los ésteres metílicos sin bromar correspondientes, es decir, oleato de metilo y linoleato de metilo. No se pudo detectar la presencia del segundo componente del TBEM, debido posiblemente a su baja concentración.

Por otra parte, se detectan dos picos que no pudieron ser identificados (tiempos de retención de 18.2 y 18.7 minutos) y cuyos espectros UV no corresponden a los clásicos de los componentes bromados sin insaturaciones C-C. También se incluye en el cromatograma el pico del estándar interno, DBHM.

3.4 Tratamiento de la Muestra

En la tabla XV se reportan los resultados obtenidos para los dos tipos de muestras preparadas. En dicha tabla se indican tanto los porcentajes de recuperación (% de Rec.) promedio obtenidos para cada uno de los analitos, así como los correspondientes coeficientes de variación en por ciento. Observamos que a mayor porcentaje de solvente mejora el porcentaje de recuperación; sin embargo, aparentemente disminuye la precisión como se refleja en los coeficientes de variación. Suponemos que la mejora en los porcentajes de recuperación se debe a una mejor dispersión del aceite en el refresco pero no nos explicamos el aumento en la dispersión de los resultados obtenidos.

TABLA XV

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO DE MUESTRA

ANALITO	MUESTRA 10% SOLVENTE		MUESTRA 15% SOLVENTE	
	% de Rec.	% C.V.	% de Rec.	% C.V.
HBEM ins.	67.0	8.8	80.5	2.4
HBEM sol.	70.0	1.1	79.2	3.9
TBEM	73.9	6.1	79.6	12.0
DBEM	72.7	5.9	73.5	15.3

En la figura 65 (Apéndice A, pp. 89) se reporta un cromatograma típico obtenido en esta etapa del trabajo experimental, dónde se observan los picos correspondientes a los analitos bromados bajo estudio.

3.5 Análisis de un Refresco

En la figura 66 (Apéndice D, pp. 127) se reporta un cromatograma típico obtenido al analizar un refresco bajo las condiciones del método gradiente. En dicho cromatograma se pueden identificar los picos correspondientes a los siguientes derivados bromados: TBEM (el primer pico) y DBEM. Así mismo, se detectan los picos de los compuestos sin bromar: oleato, linoleato y linolenato de metilo. Los dos picos de tiempos de retención de 18.3 min y 18.8 min son semejantes a los obtenidos en el análisis del aceite bromado comercial, tanto en tiempo de retención como en espectro UV.

En el refresco se cuantificaron los analitos DBEM y TBEM; los resultados correspondientes se reportan en la tabla XVI. Se indica la concentración promedio obtenida para cada analito así como el correspondiente coeficiente de variación en porciento.

TABLA XVI
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL REFRESCO

ANALITO	CONC. (ppm)	% C. V.
DBEM	1.5	12.4
TBEM	3.1	13.0

El coeficiente de variación obtenido en cada caso se encuentra dentro de los límites esperados considerando las concentraciones que se manejan. A partir de los datos encontrados no es posible calcular el contenido de aceite puesto que para ello se debe conocer la composición del aceite utilizado.

Con el análisis de este refresco se demuestra la posibilidad de aplicación del método desarrollado para el análisis de muestras reales.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se cumplió el objetivo general de este trabajo de investigación, es decir, se logró desarrollar un método analítico, utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para cuantificar aceites vegetales bromados en refrescos. Por su parte, en lo que concierne a los objetivos específicos, se tienen las siguientes conclusiones y recomendaciones.

Se demostró que es posible la caracterización de los ésteres metílicos y de sus derivados bromados utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, reportándose dos métodos de análisis para lograrlo. Así mismo, en base al método cromatográfico desarrollado con los estándares se logró la caracterización de los derivados metílicos del aceite vegetal bromado y sin bromar. Cabe señalar que al utilizar el denominado

método gradiente se recomienda que la composición del eluente sea lo mas exacta posible ya que la resolución de los picos es muy sensible a pequeños cambios en la composición empleada.

En el estudio de los aceites vegetales bromados es interesante el análisis de los diversos productos obtenidos en la reacción de bromación, según lo destacan algunos investigadores²⁴. Con relación a ese punto, la contribución de este trabajo es la siguiente: se determinó que de forma principal se forman los productos correspondientes a la reacción de adición: DBEM, TBEM y HBEM pero que no puede descartarse la posibilidad de formación de productos de deshidrobromación, ya que, sobre todo en el cromatograma del HBEM, se detectan una serie de picos de baja intensidad. Para esclarecer este punto se debe recurrir a una cromatografía preparativa que permita separar los diversos componentes detectados y así poder proceder a su caracterización por técnicas espectroscópicas.

En lo que respecta al estándar interno utilizado cabe señalar que fue un acierto la elección de un producto bromado en lugar del sugerido en la literatura sobre el tema. Efectivamente, normalmente había sido empleado el pentadecanoato de metilo,

el cuál no se comportará, frente a una extracción, de manera tan similar a los analitos bromados como nuestro estándar bromado. Aunque, por otra parte, debido precisamente a la similitud del mismo con los analitos bajo estudio no se logró la completa resolución del mismo. En este estudio no fue posible la evaluación de otro compuesto como estándar interno pero es recomendable, si se desea mejorar la precisión del método desarrollado, trabajar preferentemente con un estándar completamente resuelto; para ello se sugiere probar preparando el derivado bromado del éster metílico del ácido nonadecenoico o del ácido eicosenoico.

Un resultado importante de este trabajo fue el obtenido al elaborar las curvas de calibración. Las mismas indican que la respuesta del sistema cromatográfico es lineal en el intervalo de concentraciones esperadas para los diferentes analitos (tabla XII, pp. 52), y todos los coeficiente de correlación resultantes son significativos con 99% de confianza (t-test, valor de $t=32$).

En lo que concierne al tratamiento de muestra este involucra, en dos de sus etapas, un procedimiento de extracción. En ese punto una contribución muy relevante de este estudio fue la aplicación de sistemas de extracción en fase sólida. En la literatura

solo había sido reportado el uso de los métodos tradicionales de extracción líquido-líquido. Con el método propuesto se simplifica el trabajo mismo que además se realiza con mayor seguridad al disminuir el volumen de solvente involucrado. Esta metodología fue aplicada para la extracción del aceite vegetal bromado contenido en un refresco y para la recuperación de los analitos después de la transesterificación del aceite. En ambos casos se obtienen buenos porcentajes de recuperación y estos se podrían mejorar si se utiliza algún eluente de mayor polaridad. Se sugiere evaluar otros eluentes como podría ser el éter etílico.

En lo que concierne a la caracterización de los derivados metílicos del aceite vegetal, bromado o no, esta se logró en base al método cromatográfico desarrollado con los estándares.

Finalmente, cabe destacar que se aplicó el método propuesto en el análisis de un refresco comercial con resultados satisfactorios. De esta forma se demostró la factibilidad de utilizar la metodología desarrollada para el análisis de un problema real, lográndose la cuantificación de los diferentes ésteres bromados derivados del aceite vegetal bromado contenido en el refresco. Cabe señalar que para determinar la concentración del aceite

utilizado en un refresco determinado se debe tener una muestra del mismo para poder evaluar su composición; sobre todo si el aceite no está por completo bromado. Dicho análisis se llevaría a cabo con el método desarrollado en este trabajo. Si no es posible saber cuál aceite fue utilizado en un caso particular, se sugiere evaluar una gran cantidad de aceites bromados comerciales y obtener de esa manera una composición promedio; con esa información se podría estimar la concentración del aceite contenido en el refresco en el caso especificado. Por otra parte, sería conveniente que la legislación indicara las concentraciones máximas permitidas para cada derivado bromado y no para el aceite total ya que finalmente son estos los productos sospechosos de toxicidad y no el resto de componentes del aceite.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Claudio Bernal, María Z. Basilico y Yolanda B. Lombardo. Toxicological Effects Produced by the Chronic Intake of Brominated Vegetable Oils. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 36 (3), 432-42, 1986.
- (2) Charles V. Vorhees, Richard E. Butcher, Virginia Wootten y Robert L. Brunner. Behavioral and Reproductive Effects of Chronic Developmental Exposure to Brominated Vegetable Oil in Rats. *Teratology*, 28 (3), 309-18, 1983.
- (3) Barbara A. Jones, Ian J. Tinsley, Glenn Wilson y Robert R. Lowry. Toxicology of Brominated Fatty Acids: Metabolite Concentration and Heart and Liver Changes. *Lipids*, 18(4), 327-34, 1983.
- (4) Barbara A. Jones, Ian J. Tinsley, y Robert R. Lowry. Bromine Levels in Tissue Lipids of Rats Fed Brominated Fatty Acids. *Lipids*, 18(4), 319-26, 1983.
- (5) Y.F. Gaunt, P. Grasso y S.D. Gangolli. Brominated Maize Oil. I. Short-Term Toxicity and Bromine-Storage Studies in Rats Fed Brominated Maize Oil. *Food Cosmet. Toxicol.*, 9(1), 1-11, 1971
- (6) Y.C. Munro, B. Hand, E.J. Middleton, H.A. Heggveit y H.C. Grice. Toxic Effects of Brominated Vegetable Oils in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22(3), 432-9, 1972.
- (7) Y.C. Munro, H.A. Heggveit, H.C. Grice, S. Hasnain y F.A. Salem. Cardiotoxicity of Brominated Vegetable Oils. *Stud. Cardiac Struct. Metab.*, 1, 588-95, 1972.
- (8) Theodore M. Farber, David L. Ritter y Morris A. Bierbower. The Toxicity of Brominated Sesame Oil and Brominated Soybean Oil in Miniature Swine. *Toxicology*, 5(3), 319-35, 1976.

- (9) H.B.S. Conacher, R.K. Chadha, J.F. Lawrence, S.M. Charbonneau y F. Bryce. Mammary Transfer and Metabolism in the Rat of Halogenated Fatty Acids of Halogenated Olive Oil. *Lipids*, 19 (9), 637, 1984.
- (10) T. J. Coomes. Cloud stability in soft drinks. *Proc. Inst. of Food Sci. and Technol*, 4 (1), 33, 1971.
- (11) James F. Lawrence, Rajinder K. Chadha y Henry B.S. Conacher. Characterization of Brominated Vegetable Oils by Normal and Reversed Phase Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 10 (1), 205, 1987.
- (12) Deana L. Turner. Determination of Brominated Vegetable Oil Concentrations in Soft Drinks Using a Specific Ion Electrode. *Journal of food science*, 37, 791, 1972.
- (13) S. Green y G. Keen. A Routine Method for the Detection of Brominated Vegetable Oils in Beverages. *J. A. P. A.*, 9, 96, 1971.
- (14) Technique Detects BVO in Soft Drinks. *Chemical Weekly*, 122, 1992.
- (15) Henry B. S. Conacher y Arthur D. McKenzie. Comparison of Iodometric Titration, Potentiometric Titration and Bromide Ion Electrode Determination for Bromide in Brominated Vegetable Oils. *Journal of the AOAC*, 60 (4), 918, 1977.
- (16) H.B.S. Conacher, R. K. Chadha y M. R. Sahasrabudhe. Determination of Brominated Oils In Soft Drinks by Gas Liquid Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 46, 558, 1969.
- (17) H. B. S. Conacher. Gas Chromatographic Determination of Brominated Sesame Oil in Orange Drinks: Collaborative Study. *Journal of the AOAC*, 56 (3), 602, 1973.
- (18) James F. Lawrence, Rajinder K. Chadha y Henry B. S. Conacher. Acid Methanolysis and Gas Chromatographic Determination of Brominated Vegetable Oils in Soft Drinks. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, (6), 1385, 1983.
- (19) Rajinder K. Chadha, James F. Lawrence y H. B. S. Conacher. Use of Capillary Gas Chromatography for the Identification of Brominated Vegetable Oils. *Journal of Chromatography*, 356, 441, 1986.

- (20) H. B. S. Conacher, J. C. Meranger y J. Leroux. Levels of Brominated Vegetable Oils in Soft Drinks by X-Ray Fluorescence Spectrometry and Gas-Liquid Chromatography. *Journal of the AOAC*, 53 (3), 571, 1970.
- (21) R. A. Landowne y S. R. Lipsky. Detection Of Certain Brominated Long-Chain Fatty Acid Esters By Gas Liquid Chromatography. *Nature*, 182 (4651), 1731, 1958.
- (22) Koehler W. R., J. L. Solan y H. T. Hammond. *Anal. Biochem.*, 8 (3), 353, 1964.
- (23) Henry B. S. Conacher y Rajinder K. Chadha. Determination of Brominated Vegetable Oils in Soft Drinks by a Combination of Total Bromide Estimation and Gas Liquid Chromatography. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 57(4), 801-3, 1974.
- (24) Norma Nelly Treviño Flores. Estudio de Aceites Vegetales Bromados. *Tesis, Universidad Autónoma de Nuevo León*, 1995.
- (25) Brian A. Bidlingmeyer, F. Vincent Warren Jr., Andrea Weston y Colette Nugent. Some Practical Considerations When Determining the Void Volume in High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 29, 275-79, 1991.

APÉNDICES

APÉNDICE A

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS UTILIZANDO
EL MÉTODO ISOCRÁTICO

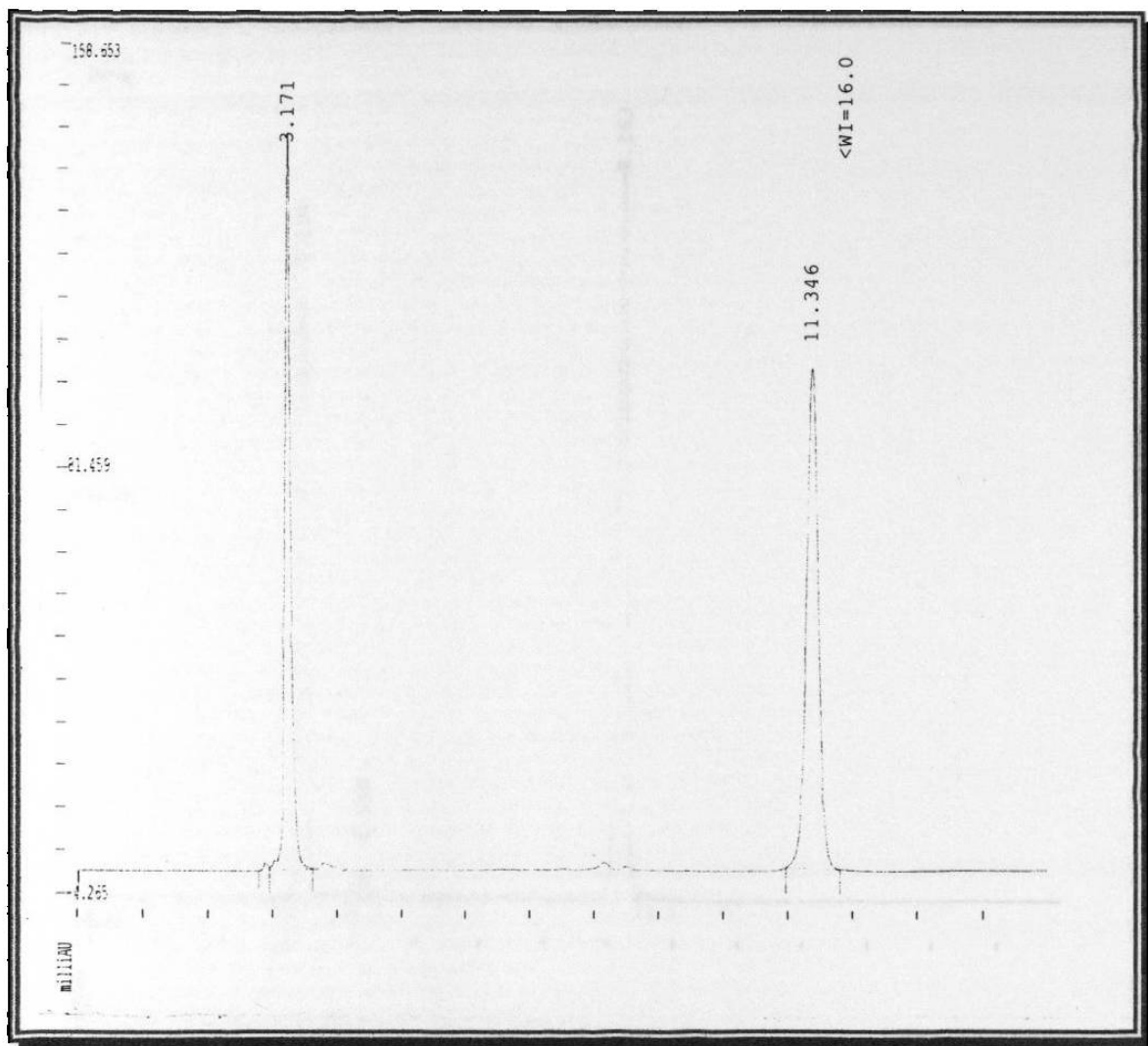


Figura 4. Cromatograma del Oleato de Metilo.

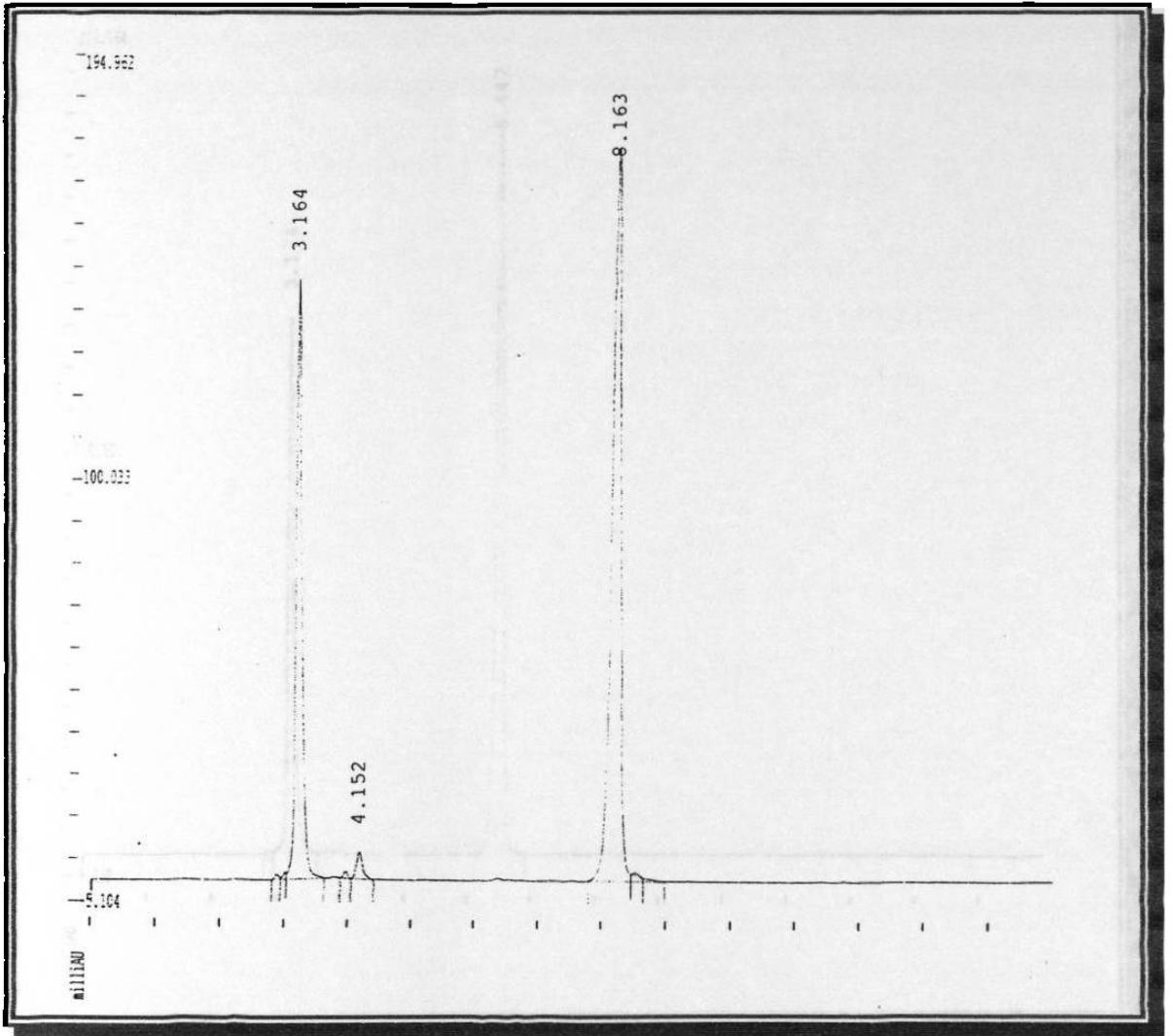


Figura 5. Cromatograma del Linoleato de Metilo.

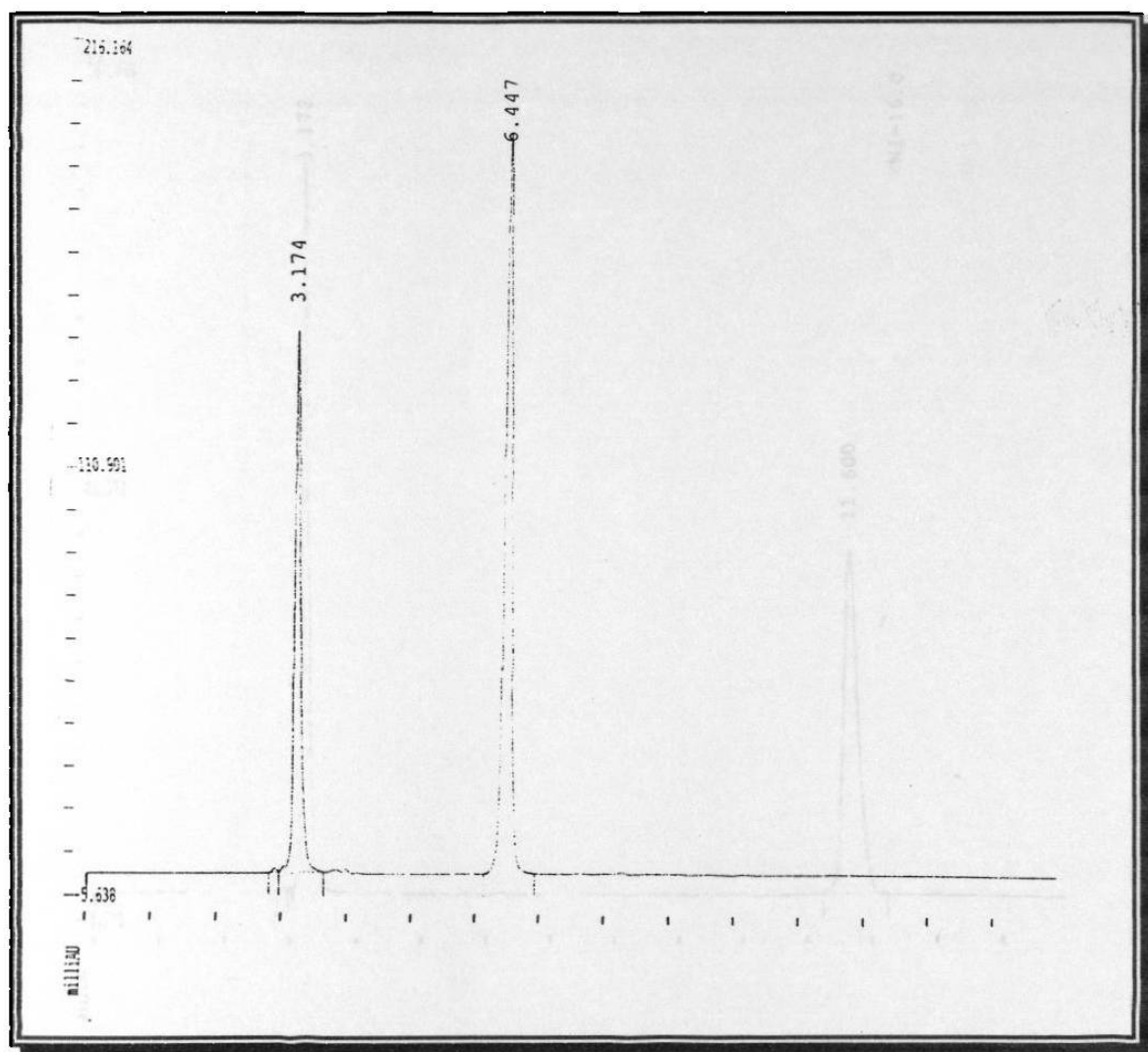


Figura 6. Cromatograma del Linoleato de Metilo.

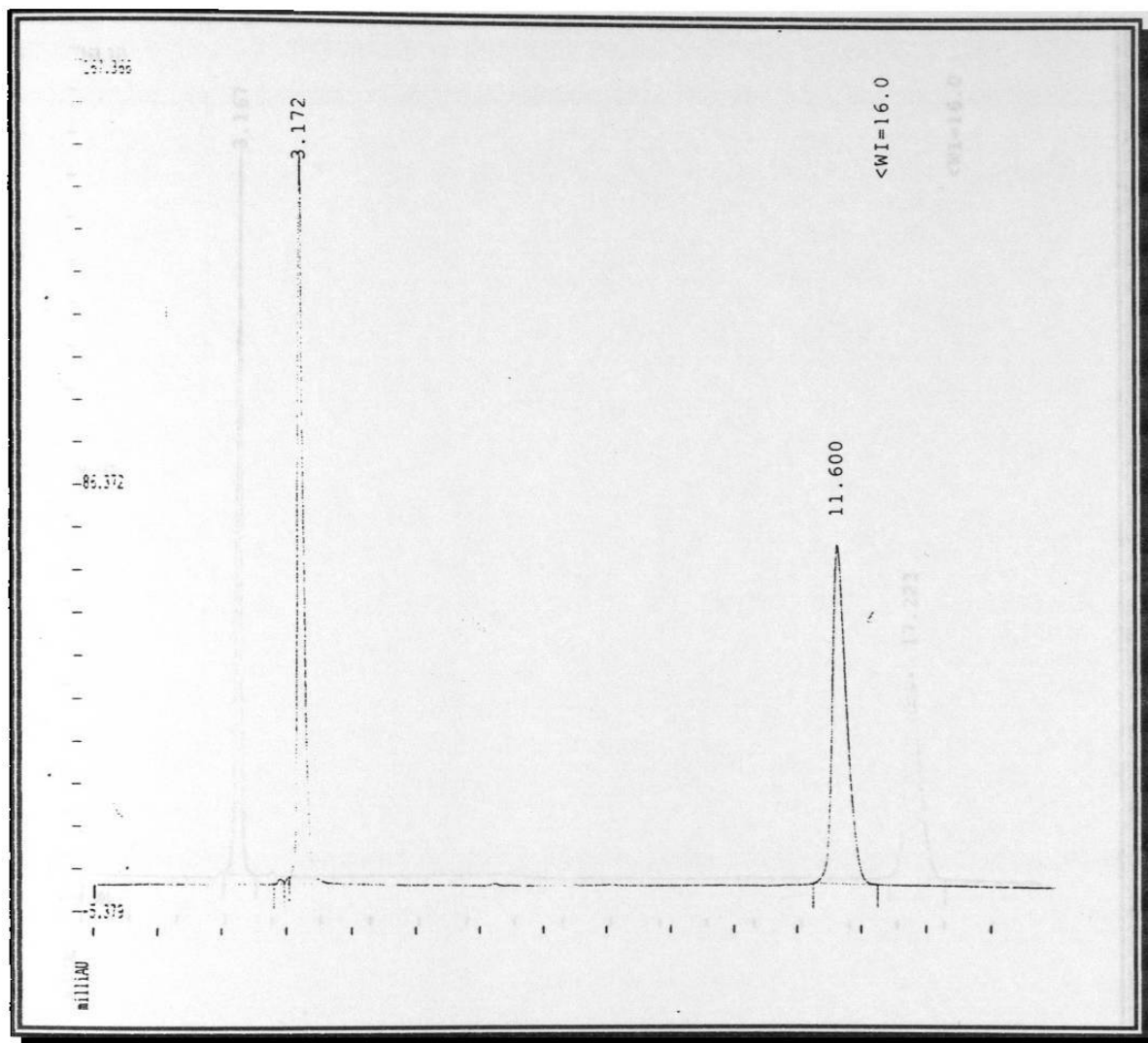


Figura 7. Cromatograma del Palmitato de Metilo.

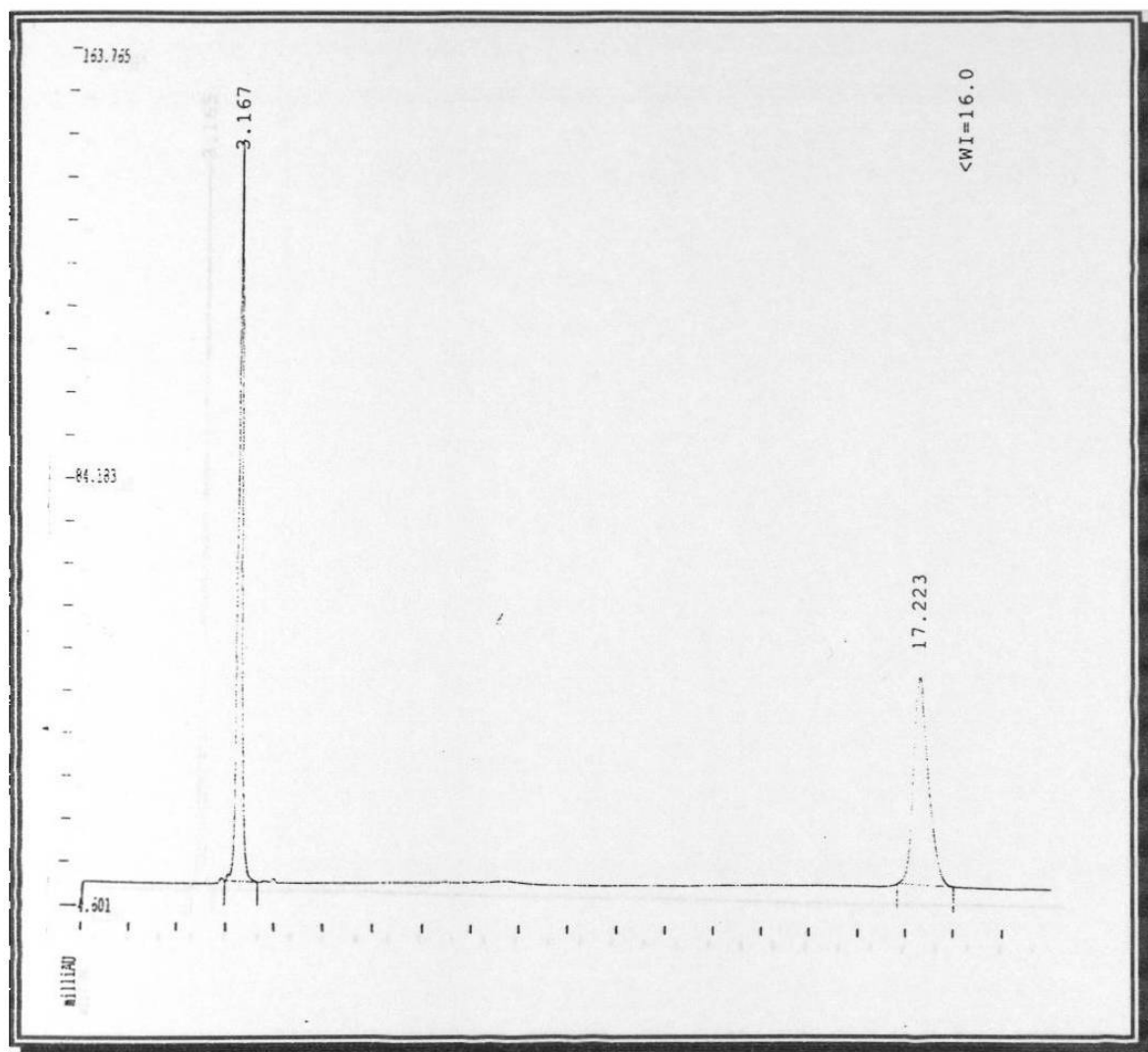


Figura 8. Cromatograma del Estearato de Metilo.

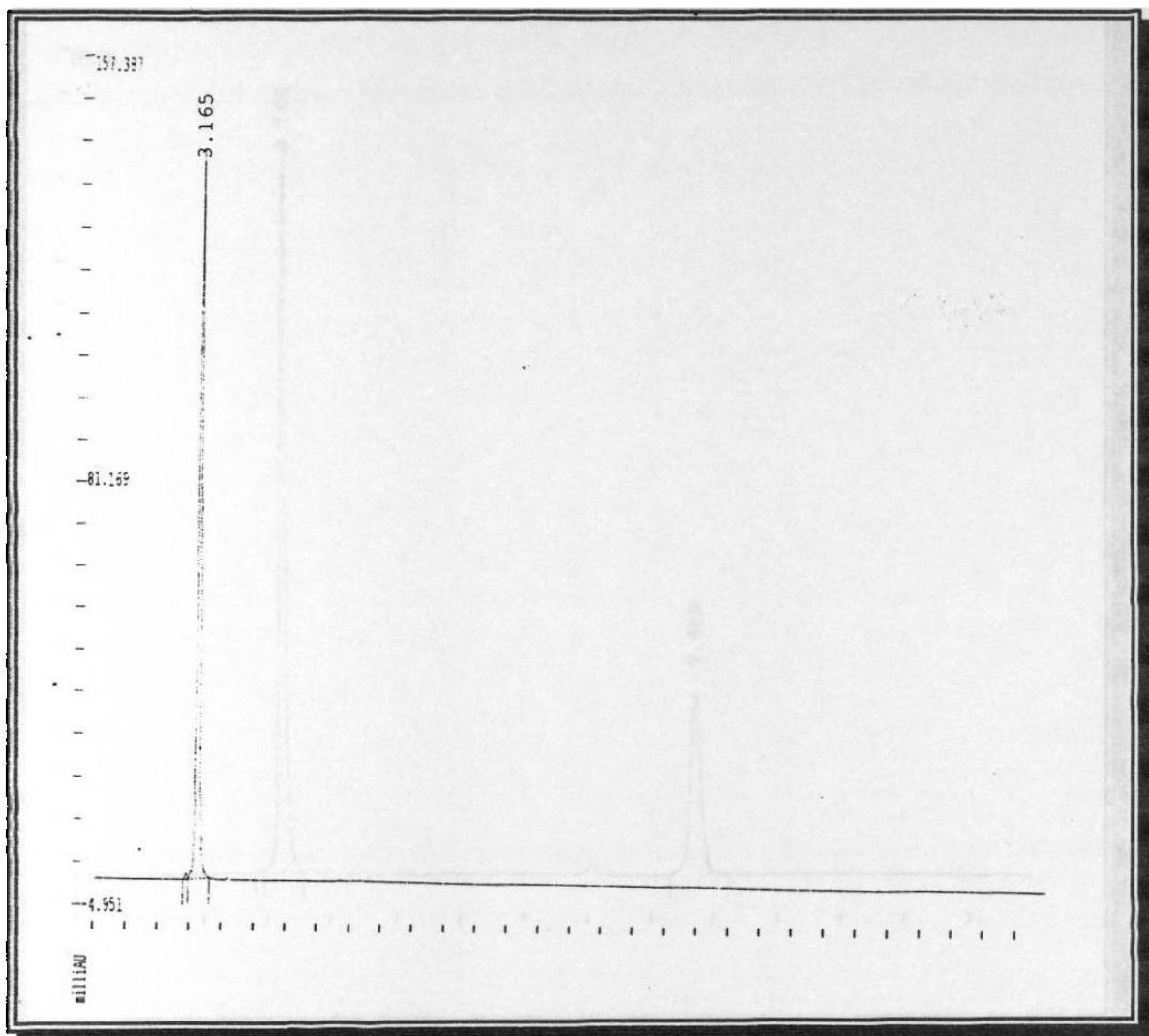


Figura 14. Cromatograma del Solvente A.

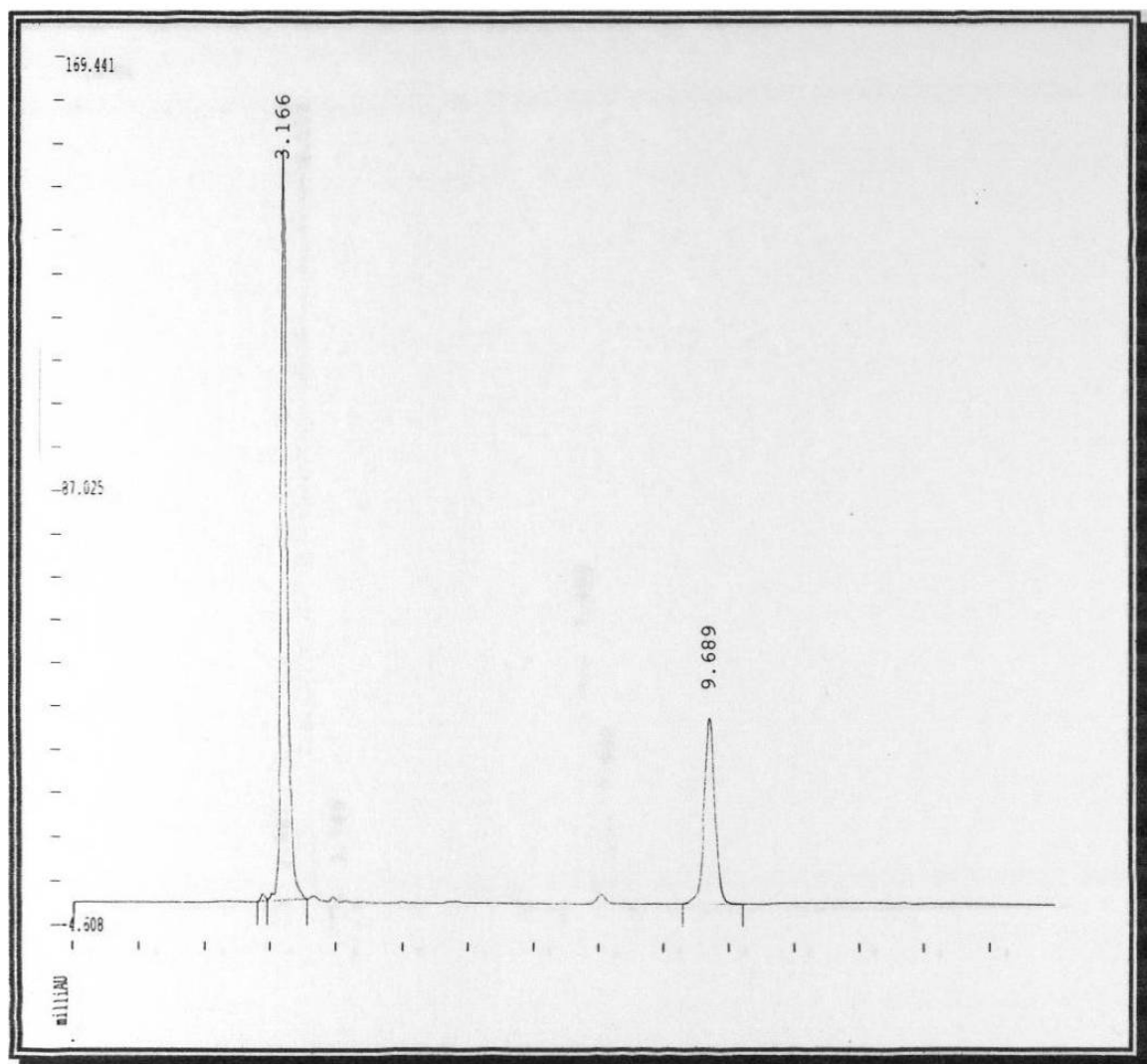


Figura 15. Cromatograma del DBEM.

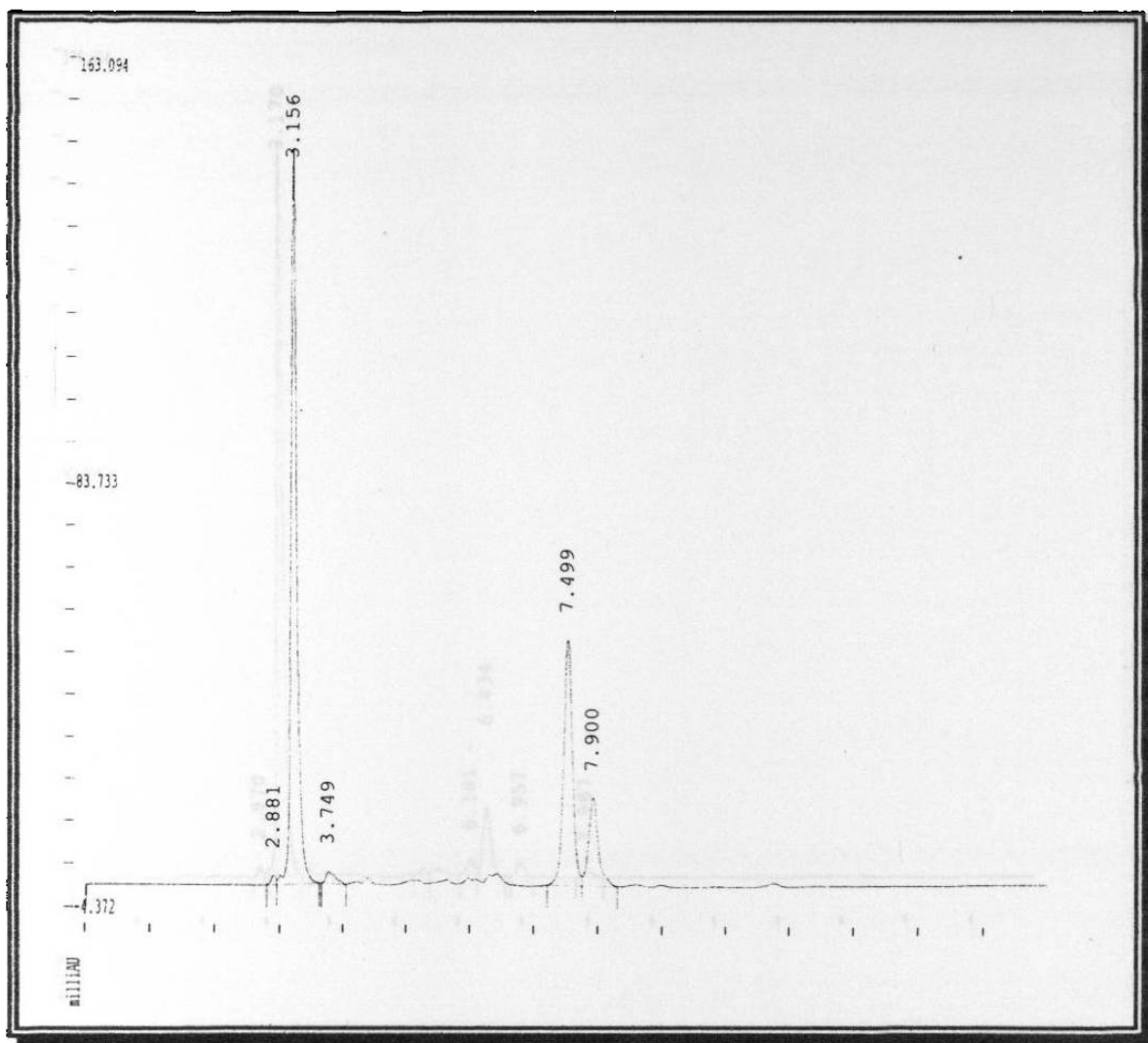


Figura 16. Cromatograma del TBEM.

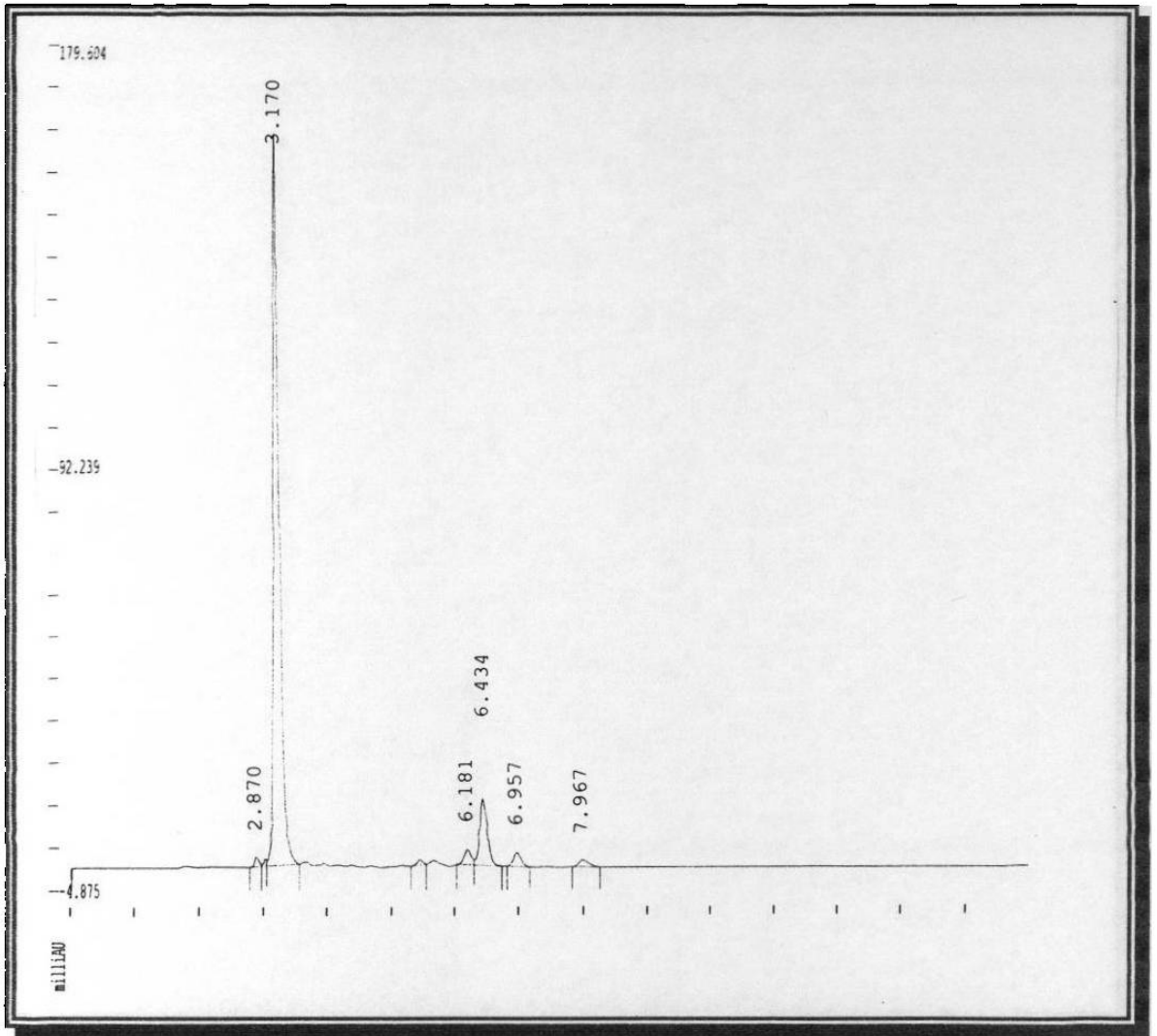


Figura 17. Cromatograma del HBEM Soluble.

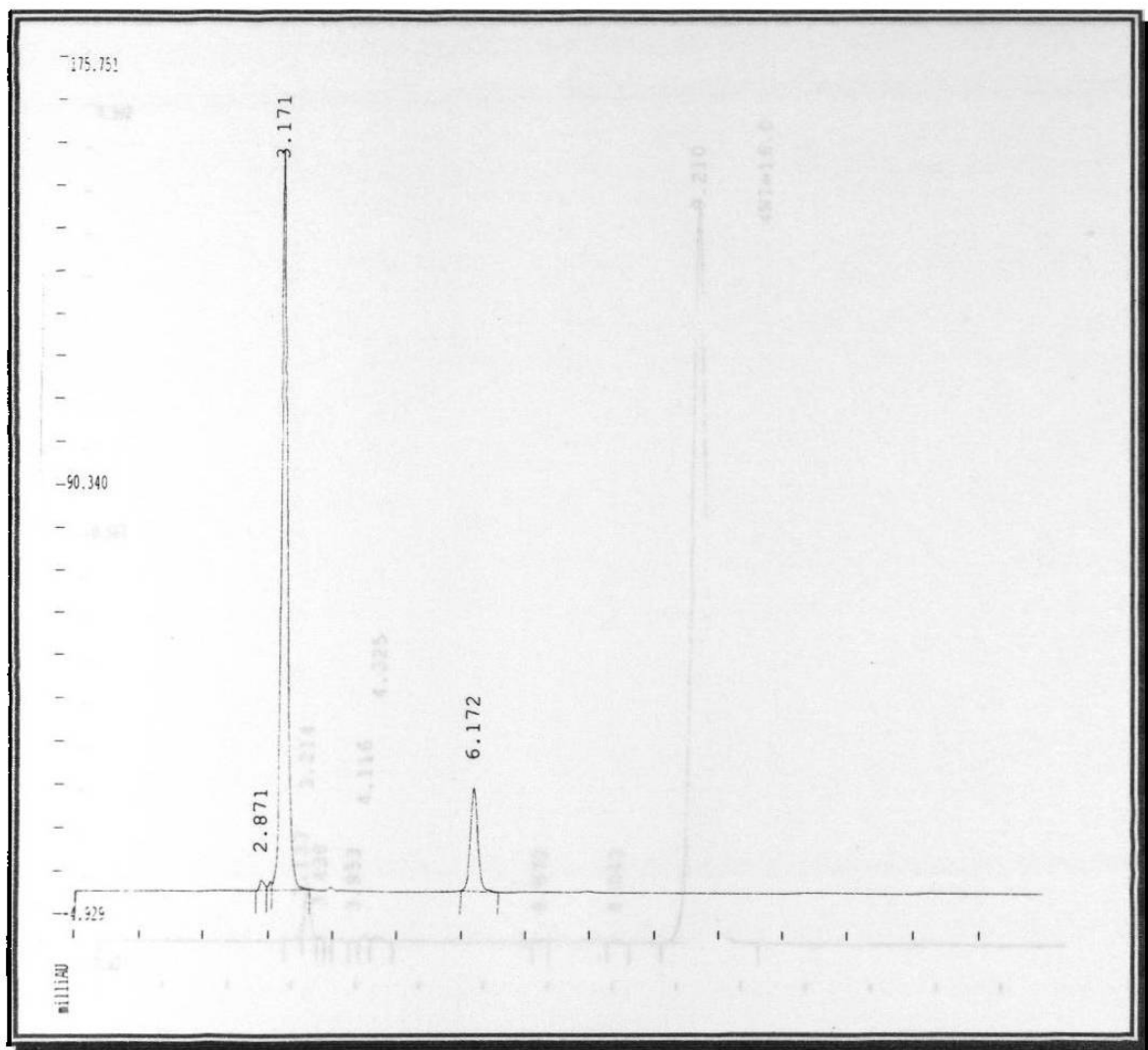


Figura 18. Cromatograma del HBEM Insoluble.

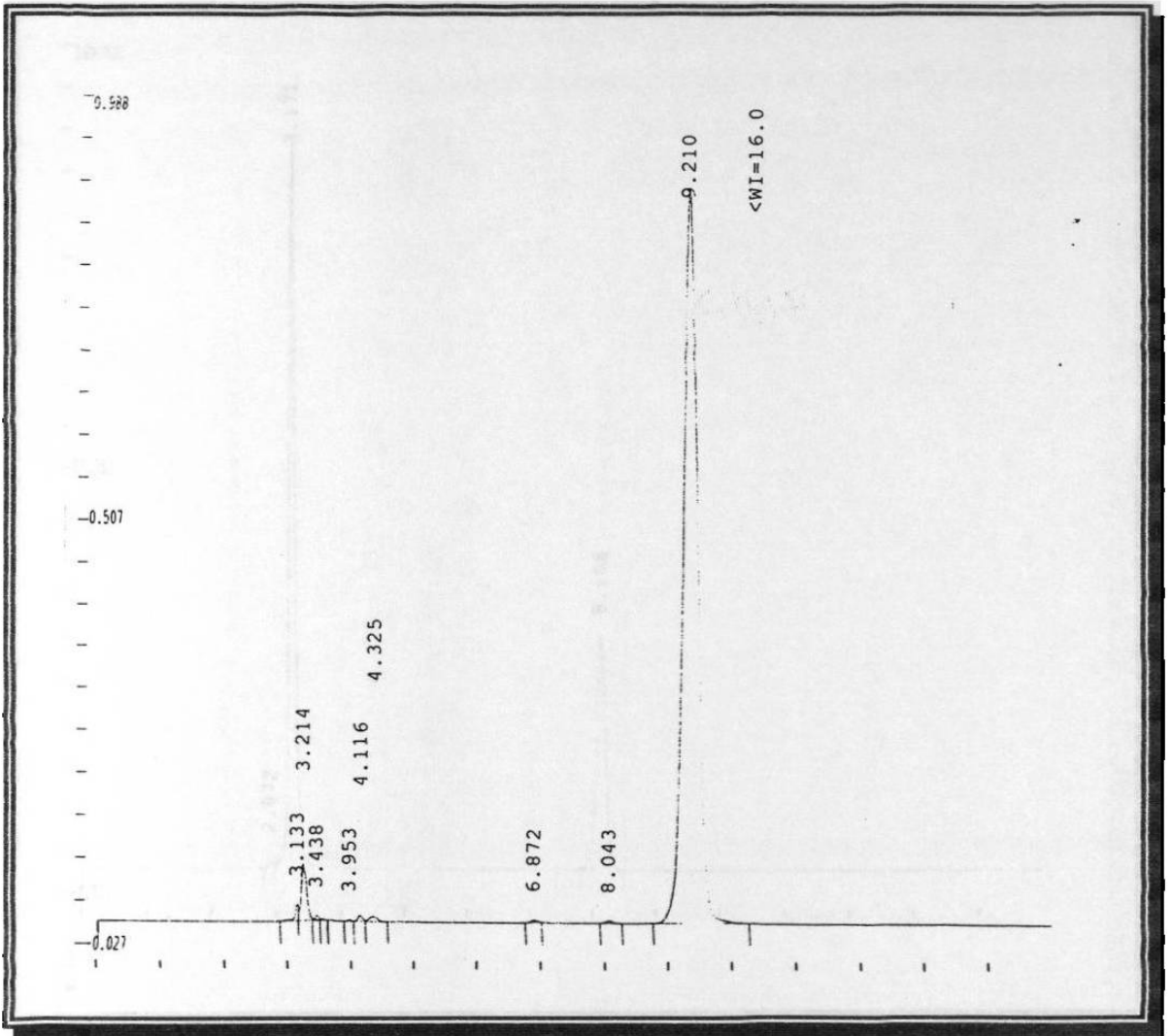


Figura 29. Cromatograma del Heptadecenoato de Metilo.

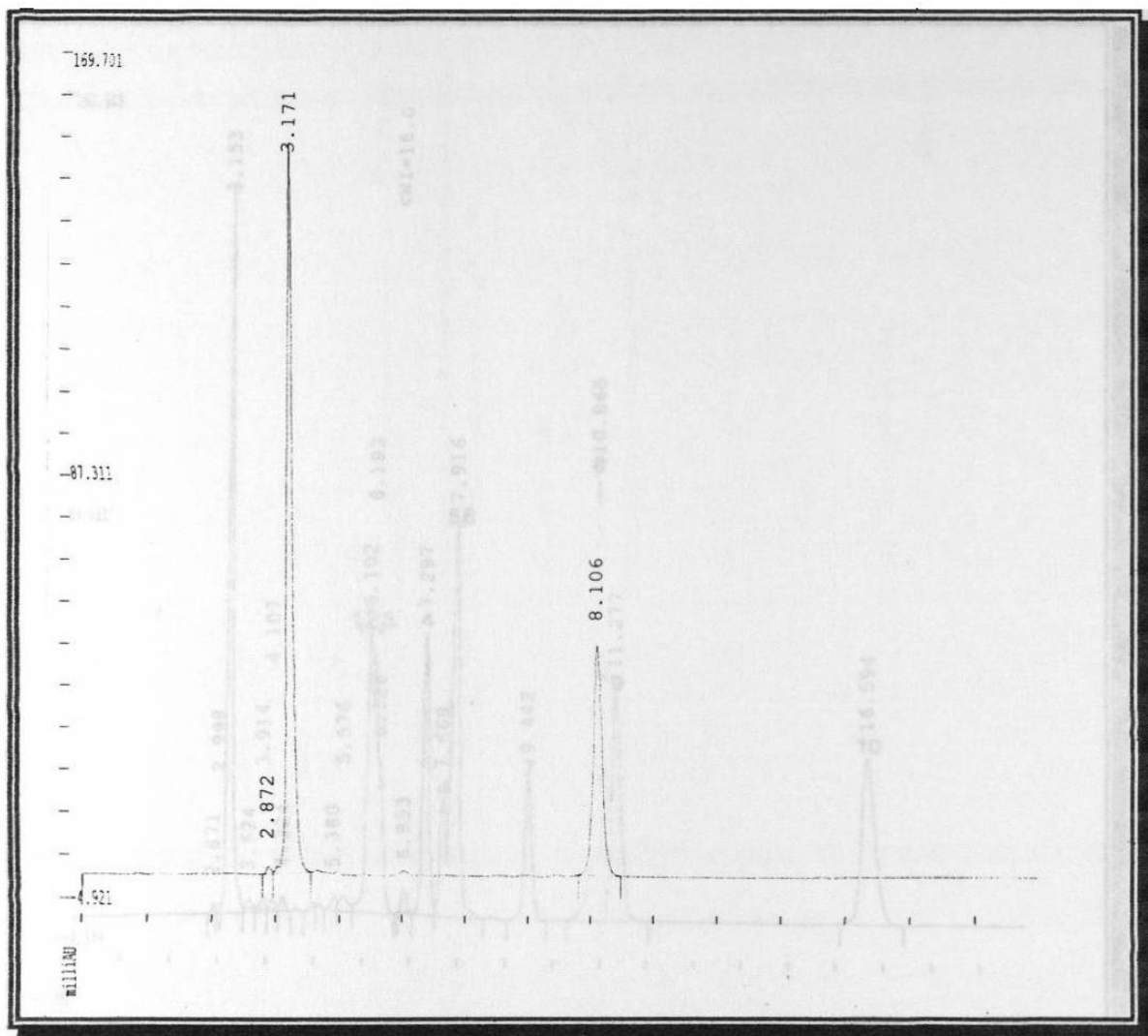


Figura 30. Cromatograma del DBHM.

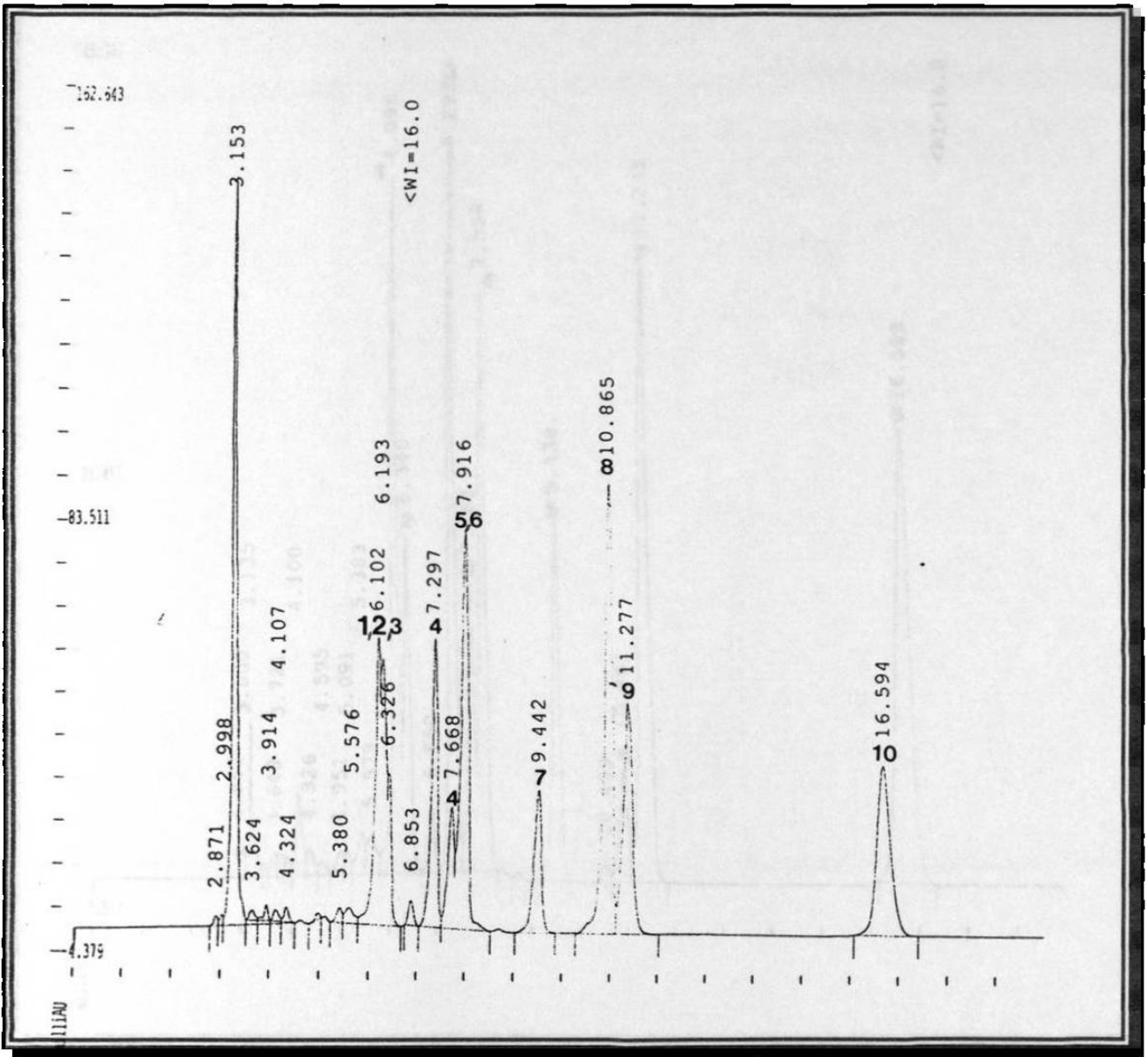


Figura 33. Cromatograma de la Mezcla de Analitos (205 nm). 1.- HBEM Insoluble, 2.- Linolenato de Metilo, 3.- HBEM Soluble, 4.- TBEM, 5.- Linoleato de Metilo 6.- DBHM, 7.- DBEM, 8.- Oleato de Metilo, 9.- Palmitato de Metilo, 10.- Estearato de Metilo.

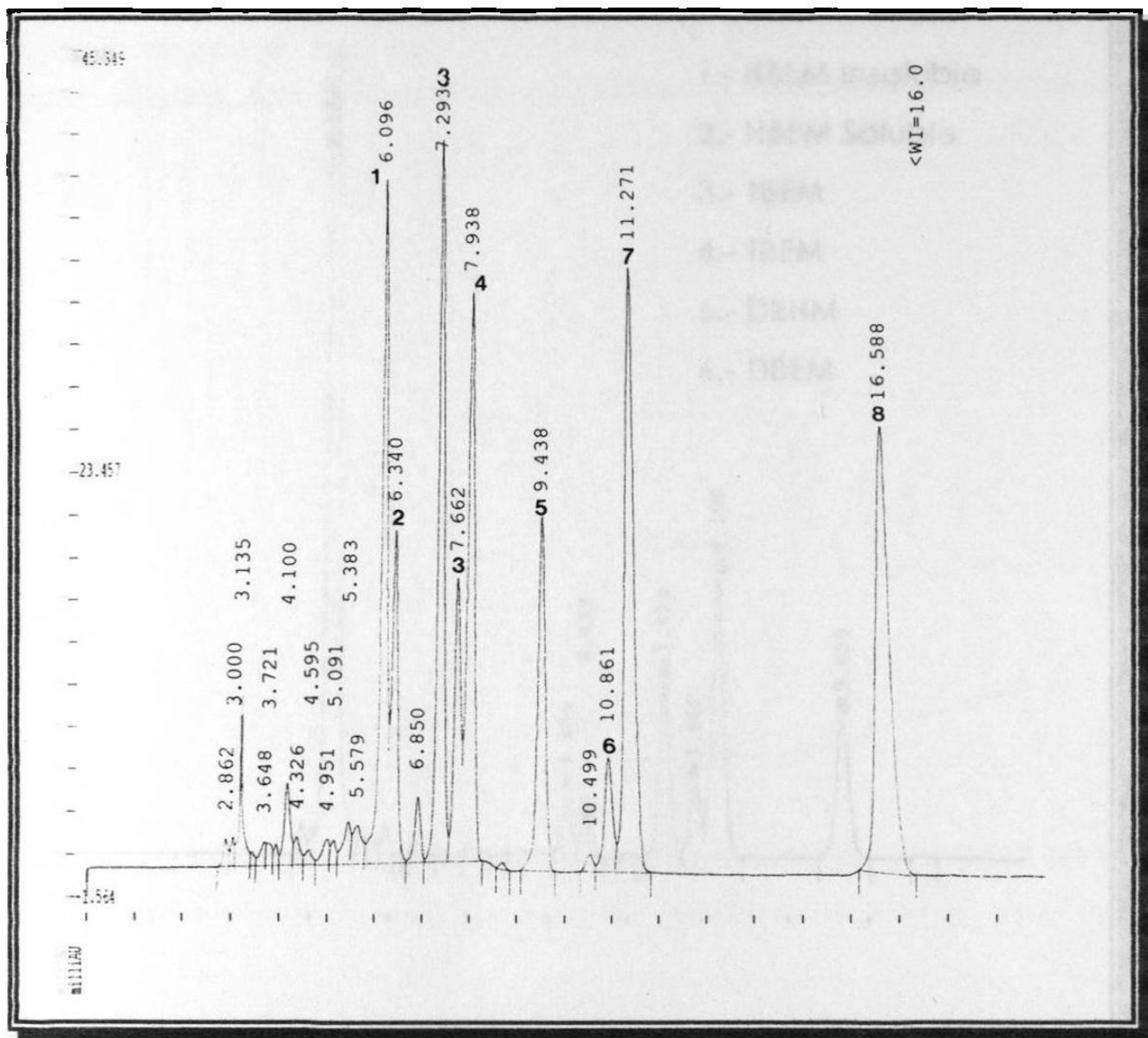


Figura 35. Cromatograma de la Mezcla de Analitos (220 nm). 1.- HBEM Insoluble, 2.- HBEM Soluble, 3.-TBEM, 4.- DBHM, 5.- DBEM, 6.- Oleato de Metilo, 7.- Palmitato de Metilo, 8.- Estearato de Metilo.

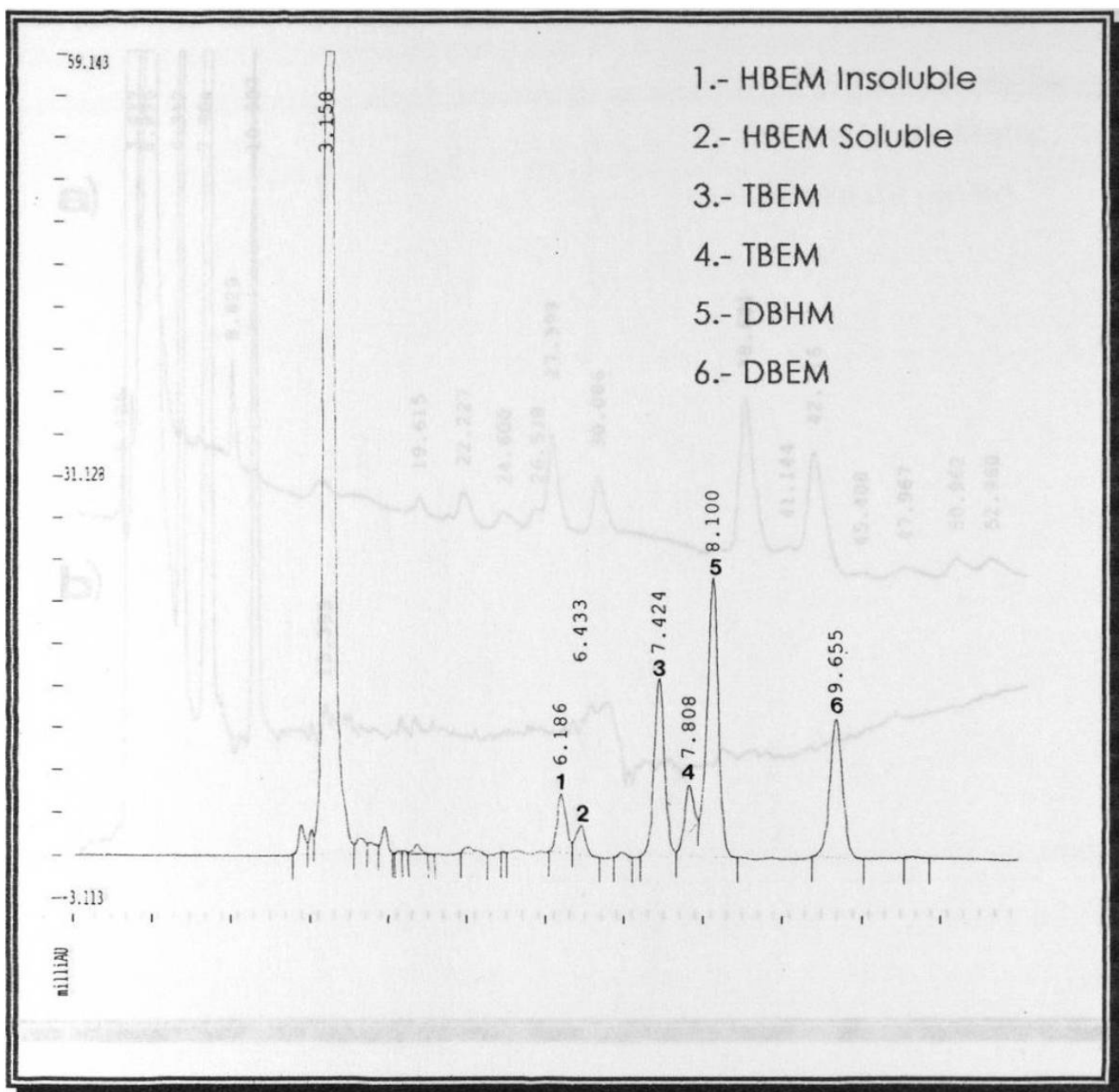


Figura 56. Cromatograma de la Solución No. 3 Utilizada en la Elaboración de las Curvas de Calibración (Método Isocrático).

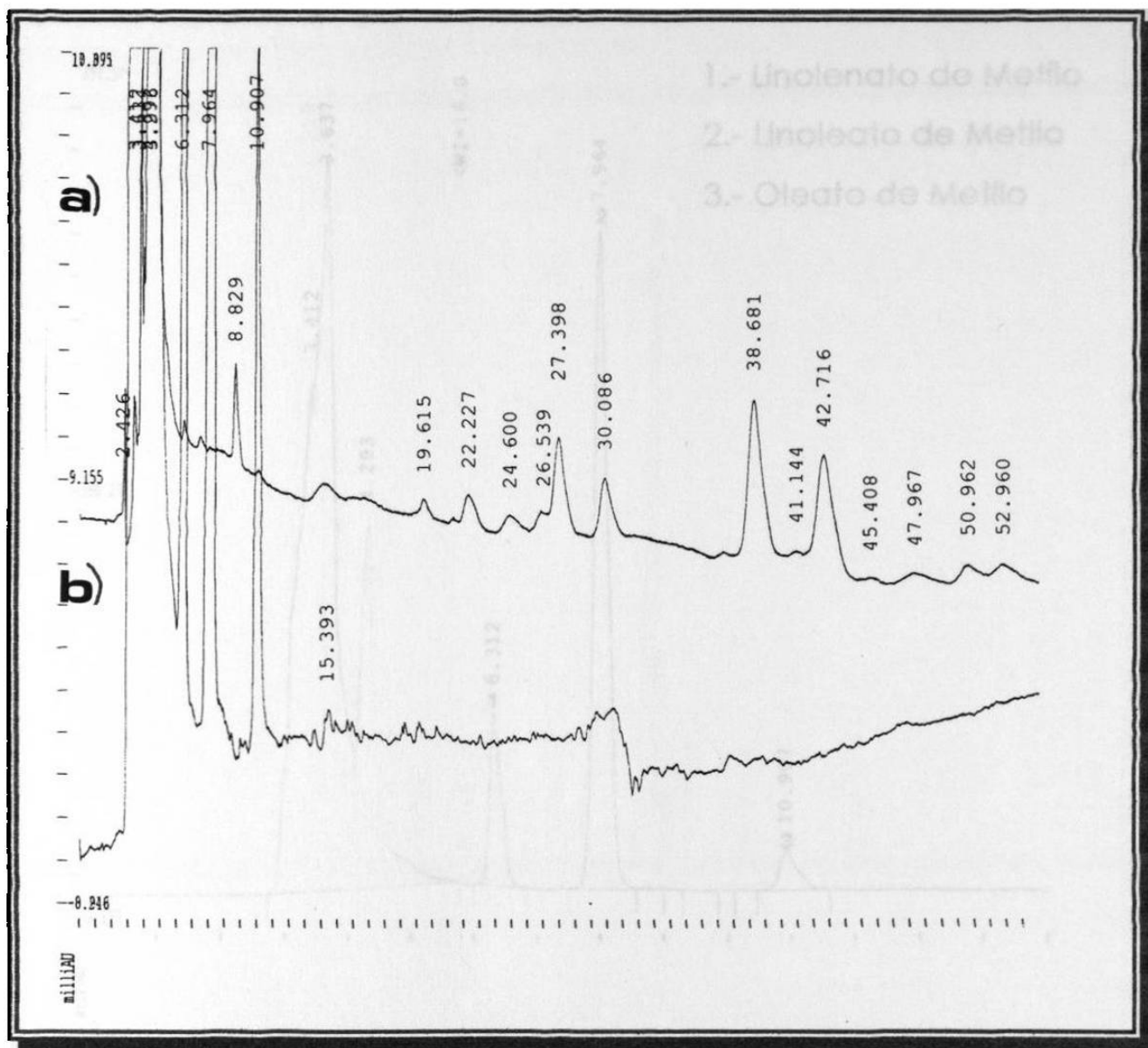


Figura 58. Cromatograma del Aceite de Soya: (a) Sin Transesterificar, (b) Transesterificado.

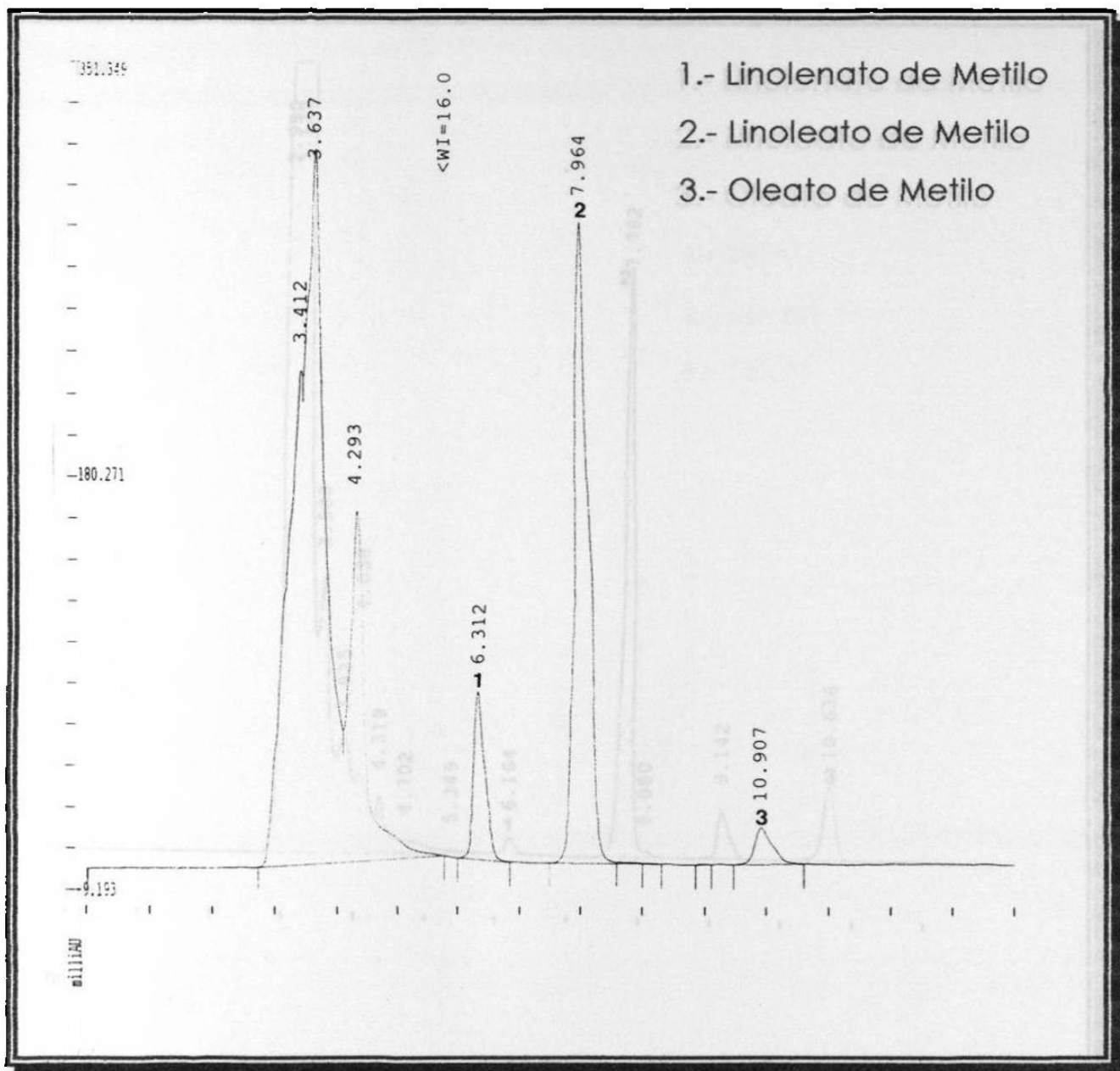


Figura 59. Cromatograma del Aceite de Soya.

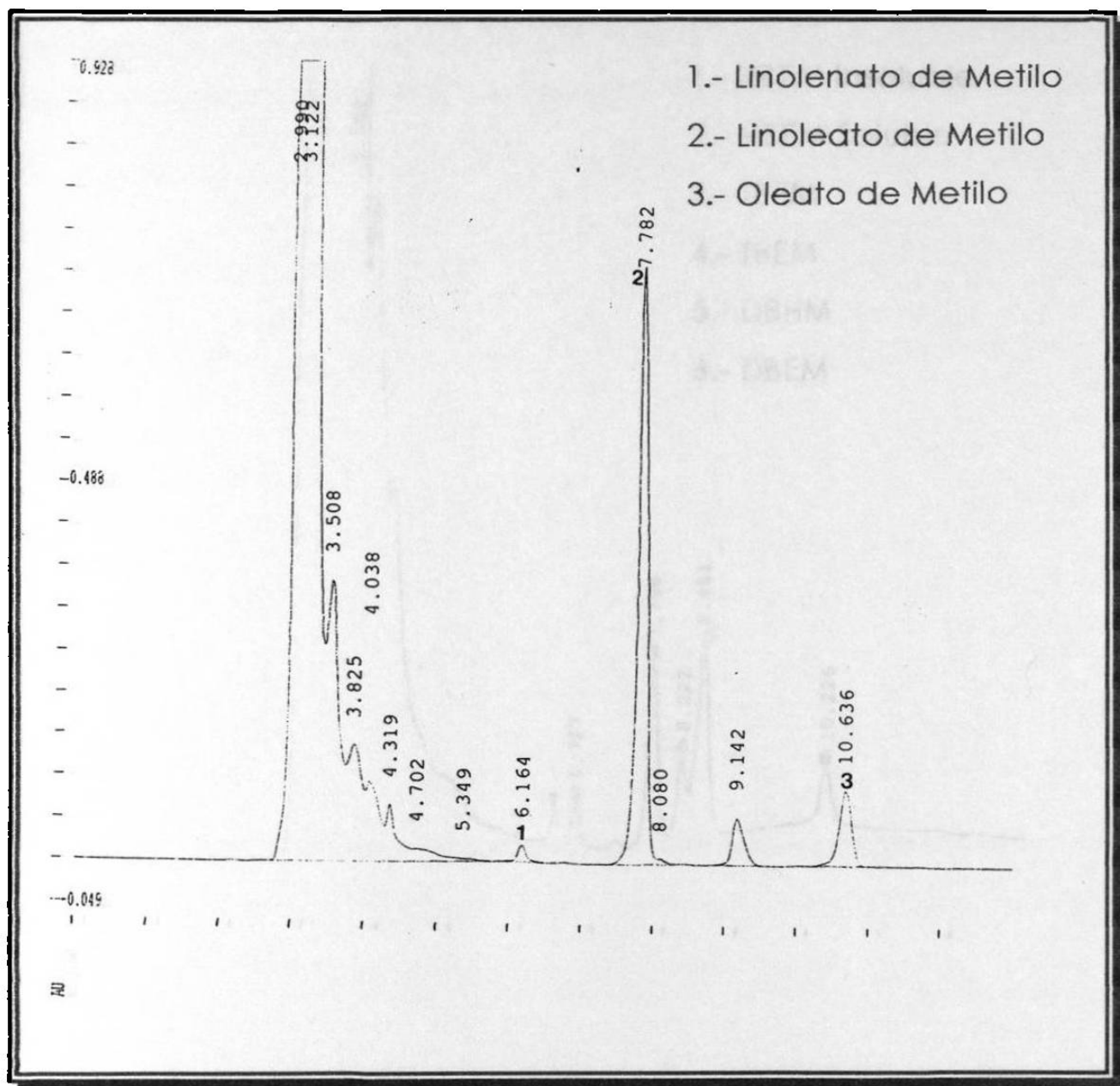


Figura 60. Cromatograma del Aceite de Maíz.

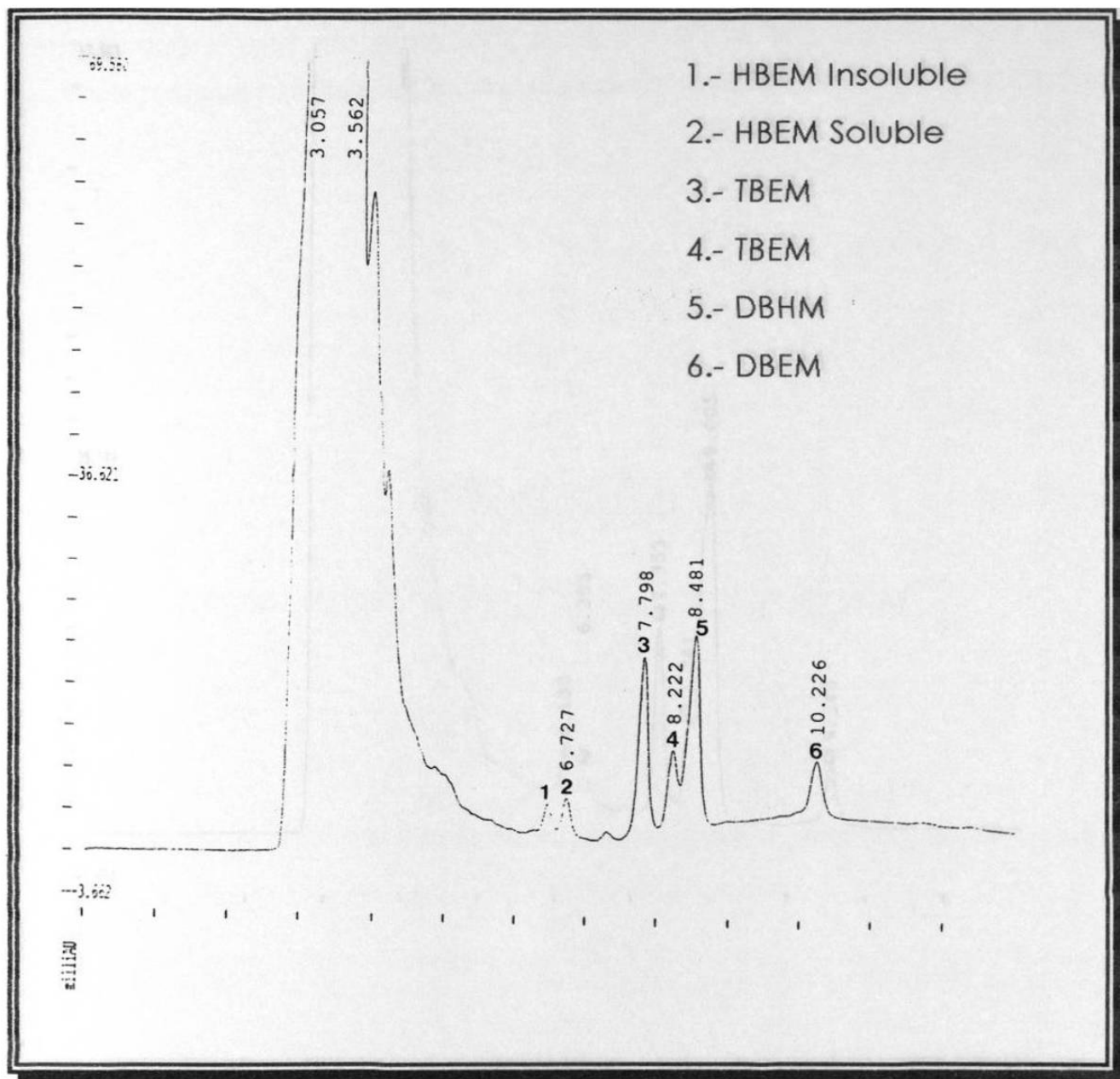


Figura 63. Cromatograma del Aceite de Soya Bromado (Método Isocrático).