

ISBN: 978-958-5542-55-6



## CARTILLA

# *PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA APLICADOS A LA AGROINDUSTRIA*



**Cartilla**

**PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRFÍA APLICADOS A LA AGROINDUSTRIA**

**Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ**

Editorial: Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Representante legal: Oscar Orlando Porras Atencia

Página web: [www.unipaz.edu.co](http://www.unipaz.edu.co)

ISBN: ISBN: 978-958-5542 -55-6

OSCAR ORLANDO PORRAS ATENCIA

**Rector Instituto Universitario de la Paz - UNIPAZ**

MÓNICA MARÍA PACHECO VALDERRAMA

**Directora de Escuela de Ingeniería Agroindustrial**

Qca. IVETTE EUNICE CASTIBLANCO CASTIBLANCO

Ing. Qco. MSc. SERGIO ANDRÉS LESMES ALFONSO

**Compiladores**

Ing. Qco. MSc. SERGIO ANDRÉS LESMES ALFONSO

**Diseñador**

Barrancabermeja - Colombia, 2021

## PRÓLOGO

La incorporación de la moderna tecnología instrumental y los adelantos en química y física han contribuido en gran medida al desarrollo actual del análisis experimental químico, mejorando las técnicas y metodologías experimentales que se consideran determinativas. La rama de la química que se ocupa de tales técnicas y metodologías es conocida como Química Analítica, de la cual se sirven muchas disciplinas entre las que destacan: La Ingeniería Química, la Ingeniería Agroindustrial, la Ingeniería de Alimentos, la Biología, la Medicina, la Bioquímica y las Ciencias Ambientales, entre otras. Esto les permite realizar avances y contribuciones gracias a la información decisiva extraída de los análisis que les brinda, sobre todo desde la cromatografía.

Wilhelm Ostwald (1894) nos habla de la importancia del análisis cuantitativo y su relevancia tanto para científicos como técnicos: *“El análisis químico experimental es el arte de reconocer compuestos diferentes y determinar sus elementos. El mismo adquiere una posición prominente entre las aplicaciones de la ciencia, por cuanto las preguntas que nos permite contestar originan por doquier procedimientos químicos que se emplean con fines científicos o técnicos. Su importancia suprema ha hecho que se lo cultive asiduamente desde un período muy antiguo en la historia de la química, y sus antecedentes comprenden una gran parte del trabajo cuantitativo que se extiende sobre todo el dominio de la ciencia”*.

Desde en el Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ, se cuenta con un equipo para cromatografía líquida HPLC 1260 *Infinity II* de Agilent Technologies y un par de equipos de cromatografía de gases 5890 *Series II plus* Hewlett Packard, que hacen parte del Laboratorio de Cromatografía. Estos contribuyen conjuntamente al desarrollo del avance en el análisis cuantitativo experimental que desde la Escuela de Ingeniería Agroindustrial se promueve en sus diferentes quehaceres, representando una oportunidad para estudiantes, comunidad e industria regional.

Los Autores.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>ORIGEN DE LA CROMATOGRAFÍA ANALÍTICA</b> .....	<b>5</b>
<b>¿EN QUÉ CONSISTE LA CROMATOGRAFÍA?</b> .....	<b>7</b>
<b>TIPOS DE CROMATOGRAFÍA</b> .....	<b>9</b>
<b>SEGÚN EL TIPO DE SOPORTE FÍSICO SOBRE EL CUAL SE DESARROLLA</b> .....	<b>9</b>
Plana .....	10
En columna.....	10
<b>SEGÚN EL ESTADO FÍSICO DE LA FASE MÓVIL</b> .....	<b>10</b>
<b>SEGÚN EL ESTADO FÍSICO DE ÁMBAS FASES Y EL MECANISMO QUE RIGE LA SEPARACIÓN</b> .....	<b>10</b>
Cromatografía Líquido - Sólido: (LSC de Liquid - Solid Chromatography).....	11
Cromatografía Líquido - Líquido (LLC de Liquid - Liquid Chromatography) .....	13
Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC de High Performance Liquid Chromatography) .....	15
Cromatografía de gases. Se subdivide en: cromatografía gas – líquido (GLC: Gas Liquid Chromatography) y cromatografía gas – sólido (GSC: Gas - Solid Chromatography) .....	18
<b>APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA EN LA AGROINDUSTRIA</b> .....	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>23</b>

## INTRODUCCIÓN

El botánico ruso Mikhail Tswett hacia 1910 describió por vez primera la cromatografía, colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) que al agregar éter pudo observar que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades.

Lastimosamente, la cromatografía quedó en el olvido por 20 años, hasta que en 1930 fue redescubierta por Kuhn y Lederer, quienes lograron la separación de carotenoides por esta técnica; a partir de este momento, su uso fue extendiendo, al tiempo que se desarrollaban diferentes versiones de esta: cromatografía de reparto (Martin y Synge, 1941), de papel (Consden, Gordon y Martin, 1944), de capa fina (Stahl, 1958), etc. Un hito importante en el desarrollo de la cromatografía lo constituyó el desarrollo de la cromatografía gas-líquido (Martin y James, 1952), técnica que encontró rápidamente aplicaciones de gran importancia, lo que llevó a su vez al desarrollo de la teoría de la separación cromatográfica (Van Deemter, 1956; Giddings, 1965, etc.) así como al desarrollo de una instrumentación que permitía un mayor control de las condiciones de trabajo.

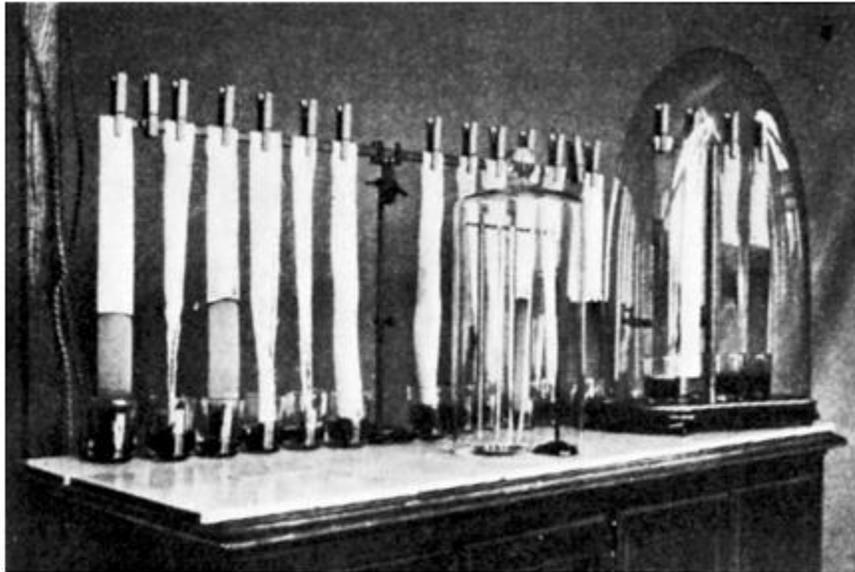
Hoy en día su aplicación se extiende a todos los campos de la ciencia y la técnica incluida la Agroindustria, en la que se utilizan tanto en su vertiente preparativa como en la analítica. Su desarrollo sobre el uso conjunto de la cromatografía con otras técnicas analíticas, así como el desarrollo de otros tipos de cromatografía, como es por ejemplo la de fluidos supercríticos, hace previsible una extensión aún mayor de su uso, logrando el análisis de compuestos agrícolas, alimenticios, aditivos minerales, fertilizantes, entre muchos otros.

## ORIGEN DE LA CROMATOGRAFÍA ANALÍTICA

Llamada así por su uso original en estudios de materiales vegetales coloreados (Strain & Sherma, 1967). El “análisis cromatográfico” ha crecido hasta abarcar separaciones de todo tipo de materiales detectados por una variedad de propiedades físicas. Friedlieb Runge (1794-1867), profesor de química en Breslau y Berlín, investigó los líquidos coloreados manchándolos en papel o tela. Los componentes se separaron en anillos que rodean el lugar. Aunque principalmente de interés artístico, las “selbständig gewachsenes bildern” (imágenes desarrolladas espontáneamente) representan ejemplos iniciales de cromatogramas circulares. A partir de la segunda mitad del siglo XIX, Friedrich Goppelsroeder trabajó extensamente con separaciones en tiras de papel. Las mezclas incluían soluciones de sales inorgánicas, tintes, productos alimenticios y fluidos biológicos. La Figura 1 muestra una fotografía del aparato de Goppelsroeder, publicada originalmente en una monografía de 1901 sobre sus hallazgos.

**Figura 1.**

*Aparato de Goppelsroeder para suspender tiras de papel, incluida una campana para mantener una atmósfera controlada.*



6

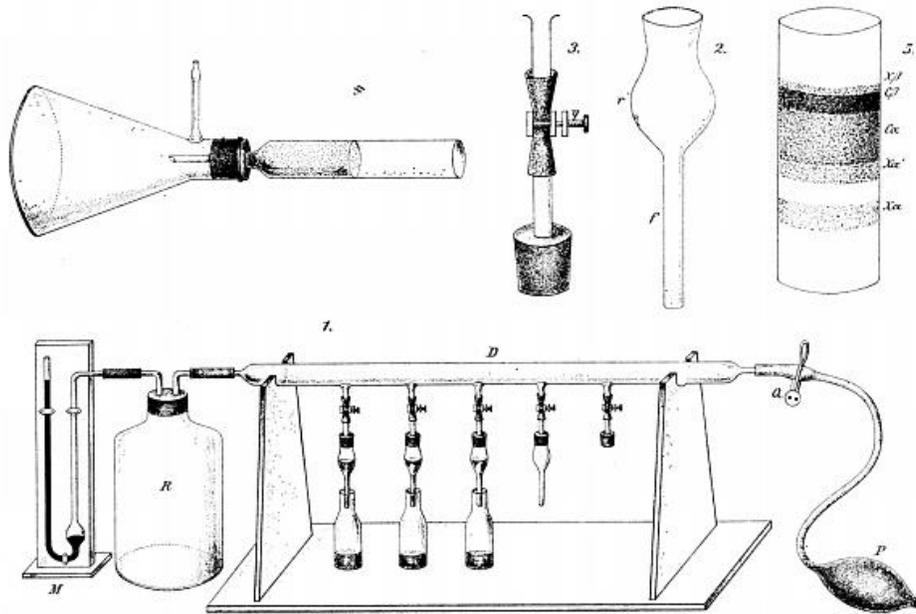
**Nota:** Imagen tomada de Williams, K. R. (2002). Colored bands: history of chromatography. *Journal of Chemical Education*,

En 1893, el inglés Lester Reed informó sobre sus estudios sobre separaciones de sales coloreadas. Además del "papel absorbente", Reed descubrió que se podían separar varias mezclas en "tubos que contenían caolín en polvo ligeramente aplastado ...". Los escritos de Runge, Goppelsroeder y Reed demuestran un interés temprano por los componentes de las sustancias coloreadas. Pero el mérito de establecer firmemente la cromatografía de adsorción como una herramienta científica es de Michael Tswett. Tswett estudió ciencias en Ginebra durante la década de 1890 y completó su doctorado en anatomía y fisiología vegetal en 1896.

En 1900, inició sus investigaciones sobre el aislamiento y la química de los pigmentos de cloroplasto, lo que llevó a la demostración de que las hojas contienen dos clorofilas, cuatro xantofilas y caroteno, hallazgos que fueron cuestionados por varios de los contemporáneos de Tswett. Para separar los componentes, hizo un amplio uso de técnicas de adsorción y perfeccionó los procedimientos para la preparación y el funcionamiento de la columna. Tswett describió su metodología en una revista botánica alemana en 1906. Strain y Sherma prepararon una traducción al inglés del artículo, que apareció en su totalidad en *Journal of Chemical Education* en 1967. La figura 2 reproduce una de las ilustraciones del artículo, que también incluye detalles de las extracciones de hojas de Tswett y sus caracterizaciones de las zonas cromatográficas. (Por cierto, Tswett reconoció que su "análisis cromatográfico" también podría aplicarse a materiales incoloros, pero comentó que "generalmente se trata de sustancias coloreadas").

**Figura 2.**

*Aparato de Tswett para múltiples columnas de adsorción.*



7

**Nota:** Imagen tomada de Williams, K. R. (2002). Colored bands: history of chromatography. *Journal of Chemical Education*,

Considerado ahora como un hito de la literatura científica, el artículo de Tswett proporciona un ejercicio de lectura interesante y valioso para estudiantes y profesores de química, así como para usuarios de métodos cromatográficos en todas las disciplinas científicas.

## ¿EN QUÉ CONSISTE LA CROMATOGRAFÍA?

La cromatografía en papel de tintes y colorantes alimentarios es un experimento estándar llevado a cabo en los laboratorios de química de primer año. Esta actividad introduce una técnica poderosa y común utilizada en química analítica. Además, demuestra la diferencia entre mezclas y sustancias puras. Finalmente, es un experimento muy colorido y atractivo que es popular entre los estudiantes.

La explicación tradicional del mecanismo de la cromatografía incluye el concepto de fase estacionaria y fase móvil. La separación de los componentes de una mezcla se basa en la diferencia de afinidad que tiene cada componente por la fase estacionaria y por la fase móvil. Esta explicación es a menudo difícil de entender para los alumnos, por lo tanto, conviene utilizar la siguiente analogía para describir el mecanismo de la cromatografía:

La cromatografía se utiliza para separar los componentes de una mezcla. Por ejemplo, imagine una mezcla de trozos de madera, guijarros y rocas grandes para separar y la configuración de cromatografía como una corriente. El agua que fluye es entonces la fase móvil y el fondo de la corriente es la fase estacionaria. Si arrojamos nuestra mezcla al arroyo, las piezas de madera se moverán libremente con el agua que fluye. La madera tiene, por tanto, una gran afinidad (o atracción) por la fase de movimiento. Las rocas grandes se quedarán en el fondo y, por tanto, tendrán una alta afinidad por la fase estacionaria. Finalmente, los guijarros rodarán lentamente por el fondo y tendrán una afinidad intermedia por la fase móvil y por la fase estacionaria. (Brozek, 1999).

Esta analogía ha demostrado ser una forma excelente de presentar el análisis cromatográfico a los estudiantes. Además de la cromatografía en papel, esta analogía también puede explicar otros tipos de cromatografía, ya que la mayoría incluye fases estacionarias y móviles.

Actualmente cromatografía es el nombre que se le da a un grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad de sustancias, en la separación de componentes de las mezclas y en la purificación de compuestos. Esta técnica es muy efectiva y por lo tanto se utiliza tanto a nivel de investigación como a nivel industrial.

Este método puede variar de técnica en técnica, pero siempre se basa en el mismo principio: Todos los sistemas de cromatografía contienen una fase estacionaria y una fase móvil.

La cromatografía es esencialmente un método de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (fase estacionaria), y otra móvil (fase móvil) la cual percola a través de la primera. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo de la fase estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que se queda fijo en la misma posición. La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria. Las sustancias que están en un sistema de cromatografía interaccionan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. La naturaleza de estas interacciones depende de las propiedades de las sustancias, así como también de la composición de la fase estacionaria. La rapidez con que viaja una sustancia a través del sistema de cromatografía depende directamente de la interacción relativa entre las sustancias y las fases móvil y estacionaria. En el caso de una mezcla, si cada componente interacciona diferente con la fase móvil y la fase estacionaria, cada uno de ellos se moverá diferente.

En la siguiente figura se observan diferentes fases móviles y fases estacionarias en diferentes técnicas de cromatografía:

**Figura 3.**

*Técnicas asociadas a cada una de las fases presentes.*

Técnica	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Sólido

**Nota:** Imagen tomada de GUÍA SOBRE PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRFÍA Y SUS APLICACIONES, disponible en: <https://repositorio.sena.edu.co/>.

### TIPOS DE CROMATOGRFÍA

Son diversos los criterios usados para la clasificación, siendo los más comunes los relacionados con:

- El tipo de técnica empleada (o soporte físico sobre el cual se lleva a cabo).
- El tipo de fase móvil utilizada.
- Según el estado físico de ambas fases.
- El mecanismo que rige la separación.

#### SEGÚN EL TIPO DE SOPORTE FÍSICO SOBRE EL CUAL SE DESARROLLA

El tipo de soporte físico sobre el cual se desarrolla el análisis cromatográfico define a la técnica en general. La fase estacionaria puede estar dispuesta sobre una superficie plana, o ser colocada en el interior de un tubo cilíndrico de vidrio o de acero inoxidable. Basándose en esto la cromatografía se puede clasificar de la siguiente manera:

➤ **Plana**

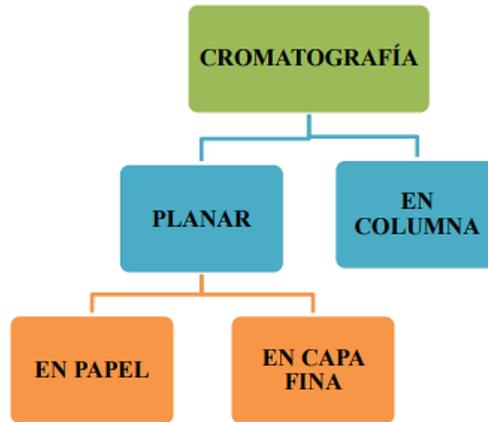
Esta fase se presenta en forma de papel o en capa fina como se describirá más adelante.

➤ **En columna**

Esta fase se presenta en forma física sobre una columna de distintos materiales, como se precisará en cada una de las técnicas.

**Figura 4.**

*Clasificación de la cromatografía de acuerdo con el soporte físico utilizado.*



*SEGÚN EL ESTADO FÍSICO DE LA FASE MÓVIL*

La fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido “supercrítico”. Un fluido supercrítico se reconoce como una sustancia sometida a presión, y calentada a una temperatura superior a su temperatura crítica, se caracteriza por poseer algunas características propias de un gas y algunas correspondientes a un líquido. Por otro lado, presenta las ventajas de tener una viscosidad menor a la de un líquido, manteniendo sus propiedades de interacción con los solutos, y ser amigable con el ambiente. Con base a este criterio las técnicas distintas técnicas cromatográficas pueden clasificarse como:

- **CROMATOGRAFÍA DE GASES**
- **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**
- **CROMATOGRAFÍA SUPERCRÍTICA**

*SEGÚN EL ESTADO FÍSICO DE ÁMBAS FASES Y EL MECANISMO QUE RIGE LA SEPARACIÓN*

Se presenta el ítem D asociado con el ítem C, puesto que el mecanismo que rige la separación de los solutos depende del estado físico de ambas fases. Como se dijo anteriormente la fase móvil, aparte de un fluido supercrítico, puede ser líquida o gaseosa y la fase estacionaria puede ser líquida o sólida. En base a esto las técnicas cromatográficas se pueden clasificar de la siguiente manera teniendo en cuenta, en primer lugar, el estado físico de la fase móvil:

- Cromatografía Líquido-Sólido (LSC de Liquid - Solid Chromatography).

- Cromatografía Líquido- Líquido (LLC de Liquid - Liquid Chromatography).
- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC de High Performance Liquid Chromatography).
- Cromatografía de gases. Se subdivide en: cromatografía gas – líquido (GLC: Gas Liquid Chromatography) y cromatografía gas – sólido (GSC: Gas - Solid Chromatography).

De otra parte, se considera que la clasificación más importante se basa en los mecanismos que rigen la separación de los solutos.

Las sustancias por separar pueden interactuar con las fases móvil y estacionaria según mecanismos de naturaleza física, química o mecánica, los cuales posibilitan tal separación. Dichos mecanismos pueden involucrar fenómenos de intercambio iónico, reparto, adsorción, exclusión y afinidad, cada uno de los cuales regirá la separación dando lugar a las siguientes “sub-clases” de técnicas cromatográficas:

### **Cromatografía Líquido - Sólido: (LSC de Liquid - Solid Chromatography)**

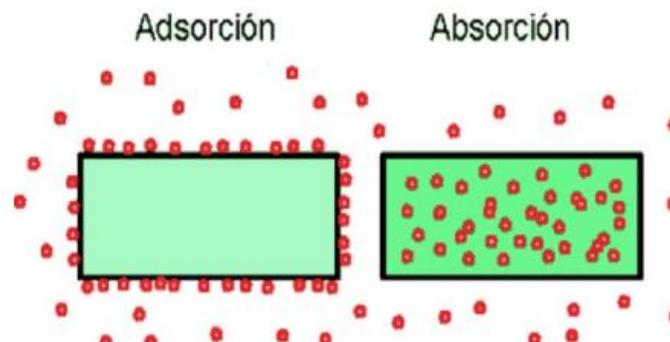
En este tipo de técnica la fase móvil es líquida y la estacionaria consiste en sólidos finamente divididos (con gran superficie específica). Los mecanismos que pueden actuar en la separación, en este tipo de técnica cromatográfica, son los siguientes:

#### CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

La fase estacionaria sólida retiene a los solutos, principalmente por efecto de fuerzas físicas de superficie del tipo de fuerzas de Van der Waals. Se emplea en la separación de compuestos orgánicos diversos, tanto líquidos como sólidos. Recordemos, en primera instancia, la diferencia entre ADSORCIÓN y ABSORCIÓN, la cual se esquematiza en la Figura 5:

**Figura 5.**

*Diferencia entre adsorción y absorción.*

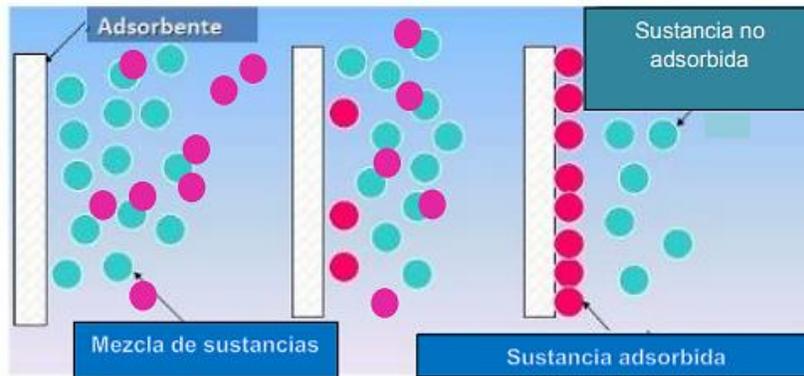


**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

La Figura 6 esquematiza el principio que rige la cromatografía de adsorción, aplicada a la separación de una mezcla constituida por dos sustancias.

**Figura 6.**

*Adsorción en la cromatografía.*



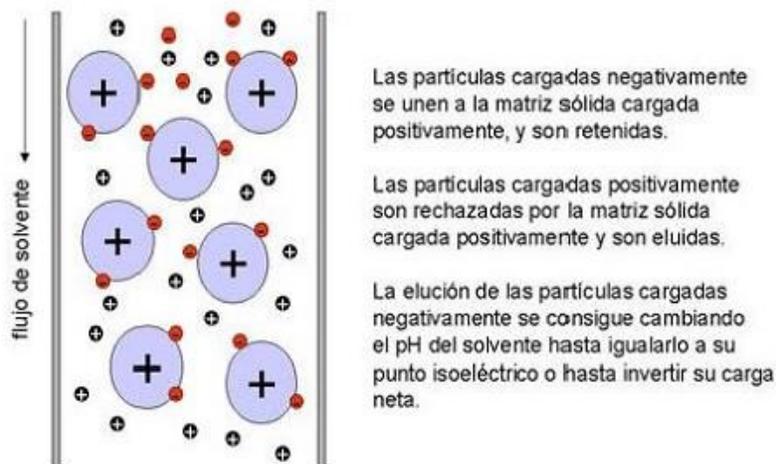
**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (IEC, de IonicExchange Chromatography)

El sólido retiene a los solutos gracias a atracciones electrostáticas. Por lo tanto, se usa con sustancias que se ionicen. La fase estacionaria sólida lleva en su superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil. La Figura 7 ilustra este principio de separación.

**Figura 7.**

*Intercambio iónico en la cromatografía.*



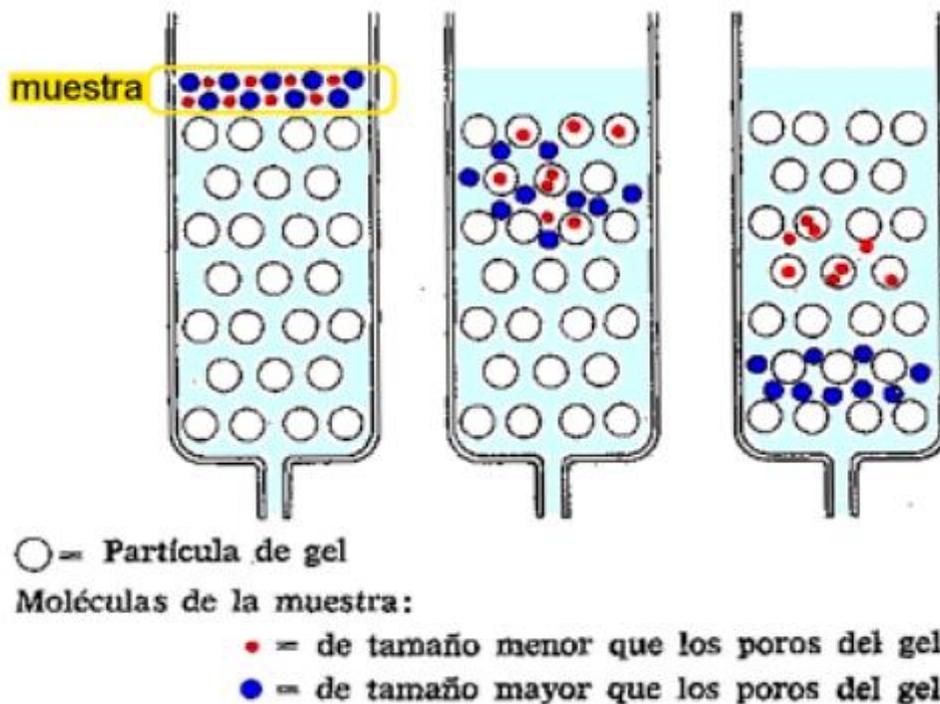
**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

**CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN (EC, de Exclusión Chromatography)**

La fase estacionaria es un material poroso que retiene a los solutos selectivamente en función de la geometría y tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación en gel, en la química de los polímeros, y de filtración en gel, en la bioquímica. Es muy útil en la separación de proteínas. La Figura 8 esquematiza este principio de separación.

**Figura 8.**

*Cromatografía de exclusión.*



**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

**Cromatografía Líquido - Líquido (LLC de Liquid - Liquid Chromatography)**

en este caso la fase estacionaria es también un líquido, inmovilizado sobre un material sólido inerte que actúa solo de soporte. Los mecanismos que rigen la separación en este caso se deben a equilibrios de distribución de los solutos, controlados por la diferente solubilidad de estos entre fase móvil y estacionaria. Dichos mecanismos son los siguientes:

**CROMATOGRAFÍA DE REPARTO**

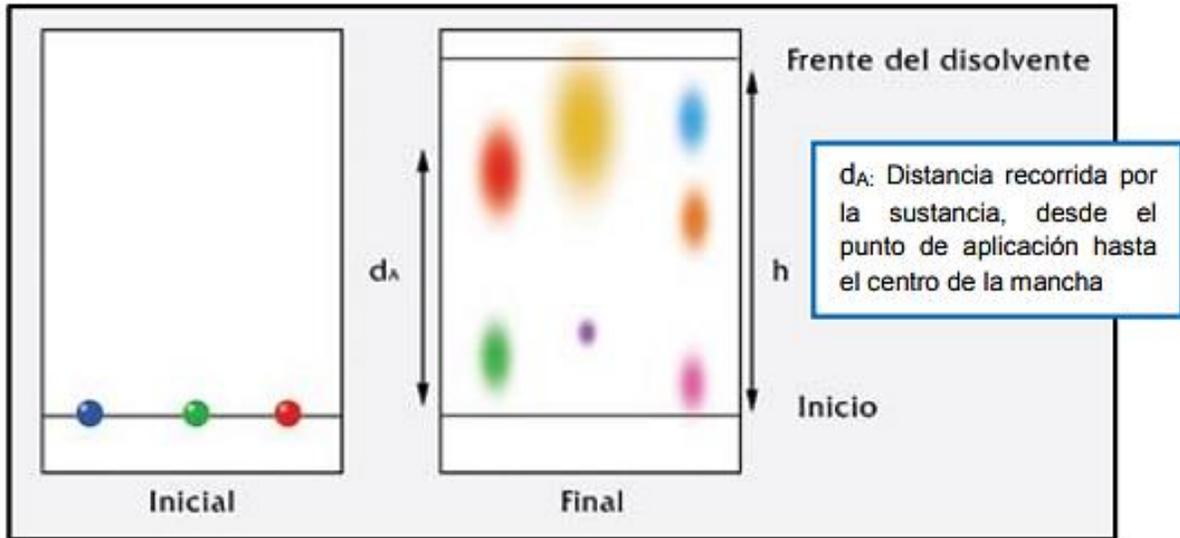
Los solutos se separan en base a las diferencias de las solubilidades de estos, entre la fase móvil y la fase estacionaria. Es la técnica más usada y, generalmente, se efectúa sobre tiras de papel de filtro, o en placas inertes recubiertas con un material adsorbente. En los capítulos

siguientes se darán mayores detalles sobre estas técnicas. Es una cromatografía líquido/líquido porque la fase estacionaria es el agua contenida en la celulosa del papel. Cuando la fase móvil (solvente orgánico) pasa sobre la fase estacionaria, las sustancias se separan “repartiéndose” entre ambas. Este mecanismo de separación se ilustra en la Figura 9.

14

**Figura 9.**

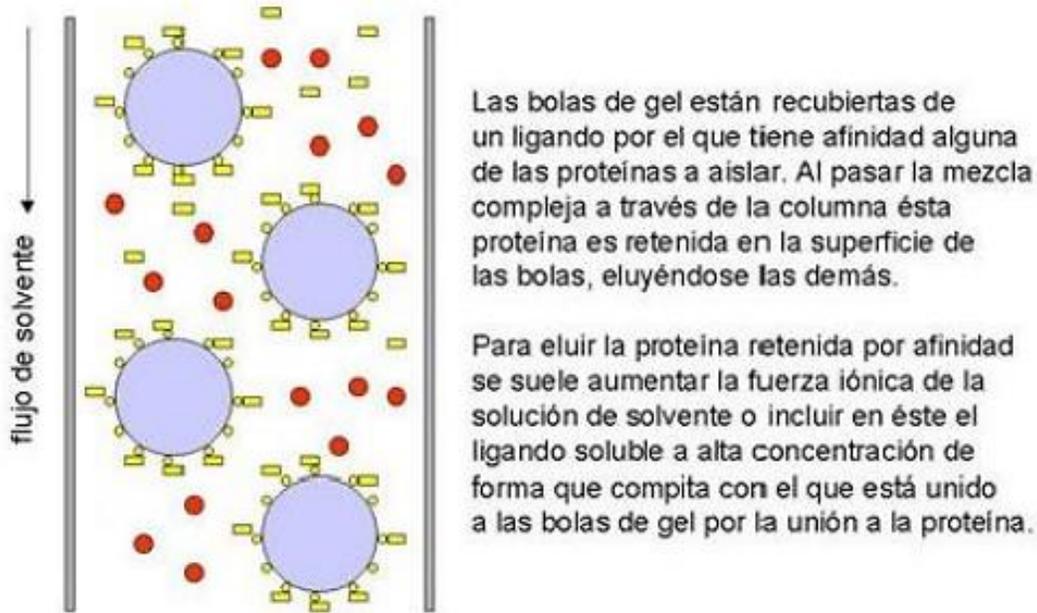
*Cromatografía de reparto.*



**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

## CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La fase estacionaria es generalmente un polímero líquido inmovilizado sobre un sólido inerte, unido por enlaces covalentes. Se aplica mucho en la separación de sustancias con importante actividad bioquímica: anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos y proteínas. La Figura 10 ejemplifica este mecanismo de separación de los solutos.

**Figura 10.*****Cromatografía de reparto.***

**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

### **Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC de High Performance Liquid Chromatography)**

Es un importante miembro dentro de las más modernas técnicas de separación. Su empleo, y el conocimiento de sus condiciones de funcionamiento y operación son considerados actualmente indispensables para los profesionales de los laboratorios químicos, farmacéuticos y bioquímicos, entre otros. Este tipo de técnica utiliza instrumentos muy sofisticados y totalmente automatizados. Es un tipo de cromatografía líquida que utiliza una pequeña cantidad de muestra (del orden de los  $\mu\text{l}$ ), la cual es eluida por la fase móvil a través de pequeñas columnas, rellenas con materiales especialmente preparados, por el efecto de altas presiones.

Si bien tiene algunas limitaciones, como ser el alto costo del equipamiento utilizado, alto costo de operación, necesidad de personal capacitado especialmente en su manejo, difícil análisis cualitativo y falta de un detector universal sensible, las mismas no impiden el aprovechamiento adecuado de sus ventajas, a saber: necesita cantidades de muestra muy pequeñas, alta resolución, resultados cuantitativos, buena sensibilidad, menor tiempo de análisis, versatilidad y automatización (existen en el mercado equipos que realizan el análisis de manera totalmente automática, desde la inyección de la muestra hasta la impresión de los resultados).

Los mecanismos involucrados en la separación de los solutos en la HPLC son los mismos que los presentados hasta el momento: adsorción, partición, exclusión e intercambio iónico. En el mercado existen columnas con rellenos (fase estacionaria) diversos, de acuerdo con el tipo de mecanismo de separación que sea necesario aplicar para lograr la separación deseada el cual, a su vez, queda determinado por el tipo de compuestos a separar. En la Figura 11 se presenta el equipo utilizado en el Instituto Universitario de la Paz -UNIPAZ y en la Figura 12 se muestra un esquema general del funcionamiento de un HPLC, las columnas empleadas en la misma y uno de los modelos existentes en el mercado para llevarla a cabo.

**Figura 11.**

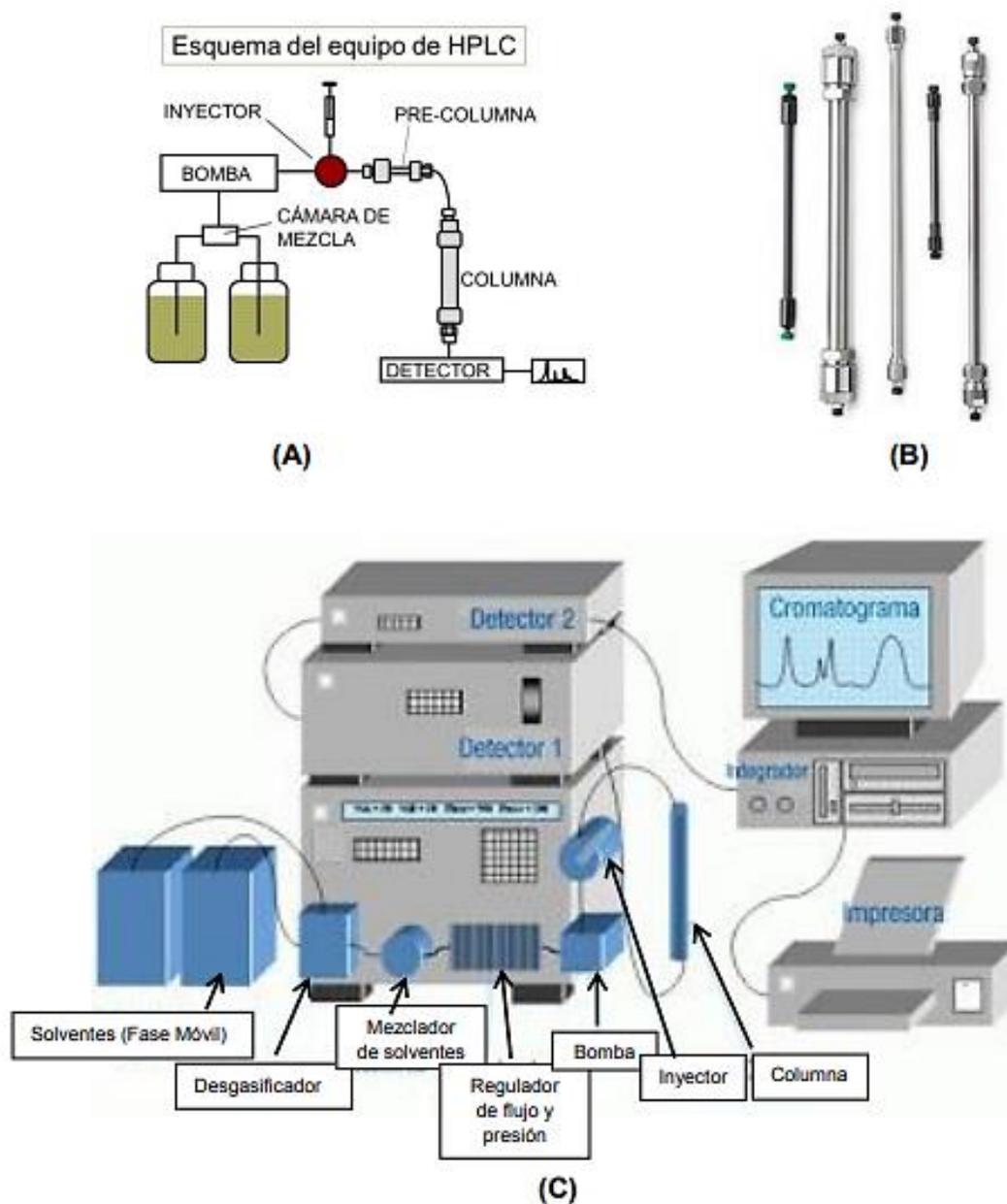
*Cromatógrafo HPLC perteneciente a la UNIPAZ.*



El desarrollo con más detalle de este tipo de técnica cromatográfica escapa al alcance de la presente Serie Didáctica. En caso de desear o necesitar profundizar en la misma, se remite al alumno a la bibliografía especializada en el tema.

Figura 12.

(A): Esquema general básico de un equipo para HPLC; (B): Columnas para HPLC; (C): Modelo de equipo para HPLC.

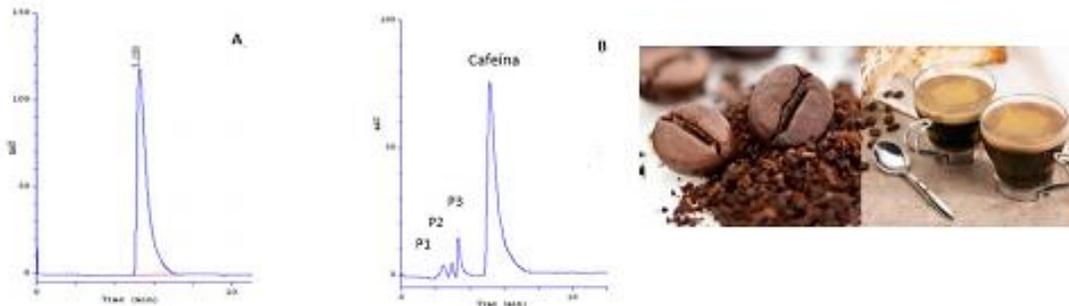


**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

La siguiente figura muestran el cromatograma obtenido por HPLC. La Figura 13 evidencia la presencia de cafeína en el café.

**Figura 13.**

*Determinación de la presencia de cafeína en el café por HPLC. Cromatograma HPLC de café. (A) Cafeína; (B) cafeína y sus productos después de 4 minutos de ozonización a pH 7.*



**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

**Cromatografía de gases.** Se subdivide en: **cromatografía gas – líquido (GLC: Gas Liquid Chromatography)** y **cromatografía gas – sólido (GSC: Gas - Solid Chromatography)**

Los gases, o mezclas de sustancias volátiles, pueden ser separados por esta técnica en la cual la fase móvil es un gas. De acuerdo con el estado físico de la fase estacionaria encontraremos: cromatografía gas-líquido (GLC: Gas Liquid Chromatography), y cromatografía gas-sólido (GSC: Gas - Solid Chromatography). La separación se basa, como siempre, en la diferente interacción de los componentes de la muestra con las fases móvil y estacionaria, debido a alguno de los siguientes fenómenos físicos:

- Adsorción (en la Cromatografía Gas – Sólido): la fase estacionaria es un sólido finamente dividido que retiene a los solutos por adsorción sobre su superficie.
- Partición (en la Cromatografía Gas – Líquido): la fase estacionaria es un líquido, retenido por impregnación o por enlaces covalentes sobre un sólido inerte. La separación queda determinada por los diferentes comportamientos de solubilidad de los solutos con la fase estacionaria líquida.

La muestra es introducida, a través de un sistema de inyección, en la columna que contiene la fase estacionaria. El uso de temperaturas convenientes en la válvula de inyección y en las columnas posibilita la evaporación de los componentes de la muestra, los cuales son eluidos (transportados) a través de la columna por la fase móvil gaseosa. Dichos componentes serán retenidos durante tiempos diferentes en el interior de la columna, de la cual saldrán en tiempos, también diferentes, de acuerdo con sus distintos grados de interacción con la fase estacionaria. El uso de un detector adecuado, a la salida de la columna, hace posible la identificación y cuantificación de las sustancias separadas.

Las columnas que se emplean en cromatografía de gases contienen la fase estacionaria y pueden ser de cobre, acero inoxidable, aluminio, vidrio, sílica fundida, teflón, etc. Idealmente, el material con el cual está confeccionada la columna no debe interactuar con el relleno ni con las sustancias presentes en la muestra analizada. Pueden ser de son de dos tipos: columnas capilares (o tubulares abiertas) y columnas empacadas como las mostradas en la Figura 14 la cual presenta, además, un esquema de un cromatógrafo de gases.

**Figura 14.**

(a) *Columnas para cromatografía de gases.* (b) *Esquema de Funcionamiento de un cromatógrafo de gases.*



**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

La Figura 15 muestra un modelo de los equipos usados para llevar a cabo una cromatografía de gases en el Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ.

**Figura 15.**

*Cromatógrafo de gases UNIPAZ.*



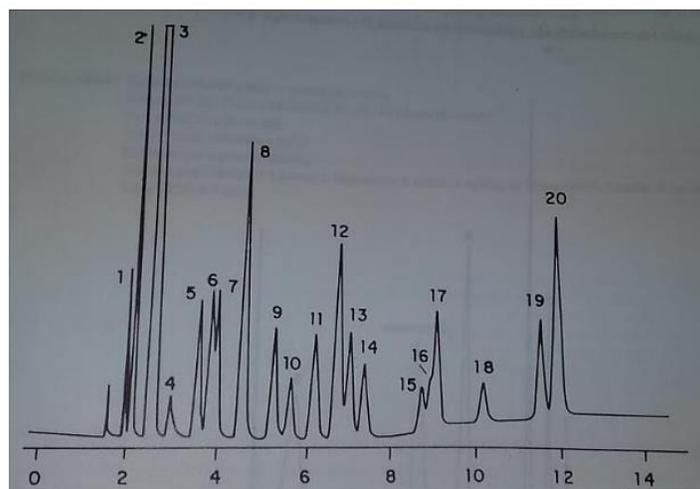
Esta técnica puede aplicarse al análisis de sustancias volátiles y térmicamente estables. En caso contrario es necesario formar un derivado con estas características, lo cual no siempre es posible.

La cromatografía gaseosa permite la separación de las sustancias presentes en una muestra, pudiendo ser usada también para su identificación. La identificación se puede efectuar comparando el tiempo de retención (como en las demás técnicas cromatográficas que se desarrollan en columna) o el volumen de retención de los componentes de la muestra con los de patrones convenientes. Una vez obtenido el cromatograma se puede efectuar la cuantificación de los compuestos separados, a través del cálculo de la altura o del área del pico presentado por cada uno de ellos.

El análisis ambiental se puede citar como un ejemplo del uso de la cromatografía gaseosa, en el control de la polución del aire, agua, suelos, etc. Controlar la contaminación atmosférica ya sea en grandes ciudades, centros industriales o el mismo ambiente de trabajo, merece atención especial debido al incremento de dolencias crónicas como cáncer de pulmón, bronquitis, asma y alergias observados actualmente. La cromatografía gaseosa puede usarse para determinar la presencia de diversos contaminantes en el aire tales como hidrocarburos, aldehídos, cetonas, compuestos policíclicos aromáticos, etc. Un análisis de esta naturaleza se muestra en la Figura 16, la cual presenta un cromatograma obtenido luego de una separación cromatográfica, en fase gaseosa, de trazas de solventes en el aire.

**Figura 16.**

*Separación cromatográfica de trazas de solventes en el aire. Columna: 10%SP-1000 sobre Supelcoport 80-100 mallas, 6m x3mm (o.d.), acero inoxidable. Fase Móvil: N<sub>2</sub> a 30 mL/min. Temperatura: isotérmica a 100°C por 6 min, después programada a 20°C/min hasta llegar a 140°C. Detector: por ionización de llama. Muestra (en CS<sub>2</sub>): (1) éter etílico; (2) iso octano; (3) disulfuro de carbono; (4) acetona; (5) tetraclorometano y 1,1,1-tricloroetano; (6) butan-2-ona; (7) diclorometano; (8) benceno; (9) tricloroetileno; (10) cloroformo; (11) tetracloroetileno; (12) tolueno; (13) 1,2-dicloroetano; (14) dioxano; (15) etilbenceno; (16) p-xileno; (17) m-xileno; (18) o-xileno; (19) 1,1,2-tricloroetano; (20) estireno.*



**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

## APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA EN LA AGROINDUSTRIA

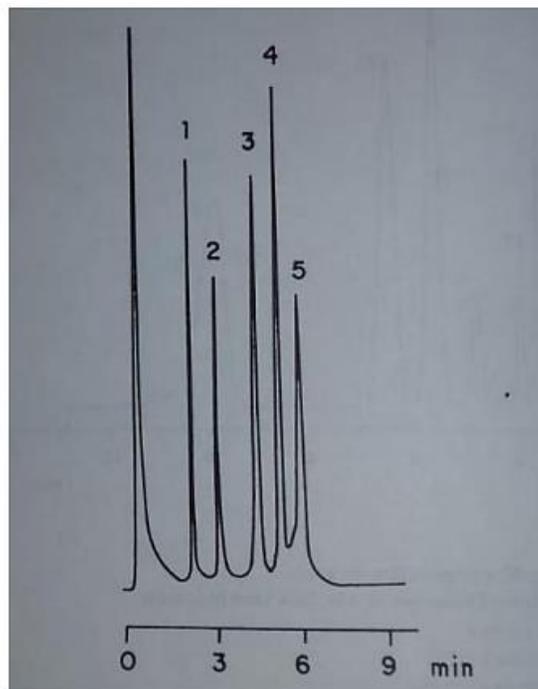
Las aplicaciones en la agroindustria van desde la investigación hasta la práctica en campo ejemplo de estas son:

En la industria alimenticia, una de las ramas más plurales de la agroindustria, usa la cromatografía gaseosa para el análisis de algunos constituyentes de alimentos tales como lípidos y carbohidratos. En algunos casos, como el mostrado en la Figura 17, con técnicas adecuadas de concentración de la muestra se pueden detectar componentes alimenticios que se encuentran a nivel de trazas, como esteroides y vitaminas.

Además, la cromatografía gaseosa es usada frecuentemente, en conjunto con la cromatografía en capa delgada, para estudiar adulteración, contaminación y descomposición de alimentos.

### Figura 17.

*Separación cromatográfica de algunos esteroides. Columna: 3% OV-17 sobre Chromsorb W-HP, 100-120 mallas, 2m x4mm, de vidrio. Fase Móvil: N<sub>2</sub> a 34 mL/min. Temperatura: isotérmica a 280°C. Detección: por ionización de llama. Muestra: (1) androsterona; (2) estradiol; (3) progesterona; (4) colesterol; (5) hidrocortisona.*



**Nota:** Imagen tomada de Técnicas de Análisis en Química Orgánica, disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/>

Debido a la rapidez de las técnicas cromatográficas han tenido gran auge. Sin embargo, la mayoría de las veces necesita de etapas previas de preparación de las muestras para que no haya interferencias durante el análisis ni contaminación de la columna cromatográfica, etapas que generalmente son largas y complejas, incrementando considerablemente el tiempo y costo del análisis. Por otro lado, la cromatografía gaseosa no es una técnica cualitativa eficiente y, muchas veces, necesita de técnicas auxiliares para la identificación segura de las sustancias presentes en la muestra.

Otras de las aplicaciones en la agroindustria incluyen “compost altoandino e interacción con harina de rocas y su efecto en las plantas y la fertilidad de suelos”, este estudio en sus conclusiones menciona que “la técnica de cromatografía coayuda en el seguimiento y evaluación del proceso de biorremediación, al reflejar cualitativamente la actividad enzimática de los microorganismos, tomándose las medidas correctivas oportunas para lograr la biorrecuperación completa”. (Chilón & Chilón, 2014, p. 36). Así mismo, Gordillo y Chavéz (2011) realizaron una evaluación comparativa de la calidad de compost de desechos agroindustriales azucareros, y en su análisis determinaron diferentes niveles de materia orgánica gracias a la cromatografía.

Con este enfoque, igualmente se ha notificado el “análisis de un sistema de cromatografía de campo para evaluación de calidad de suelos y compost en empresas asociadas a ECOFAS” (Heredia, 2012), en este trabajo se hace análisis a empresas de cultivadores de flores orgánicas, en donde la cromatografía ayuda a contrastar los diferentes resultados químicos obtenidos con técnicas convencionales.

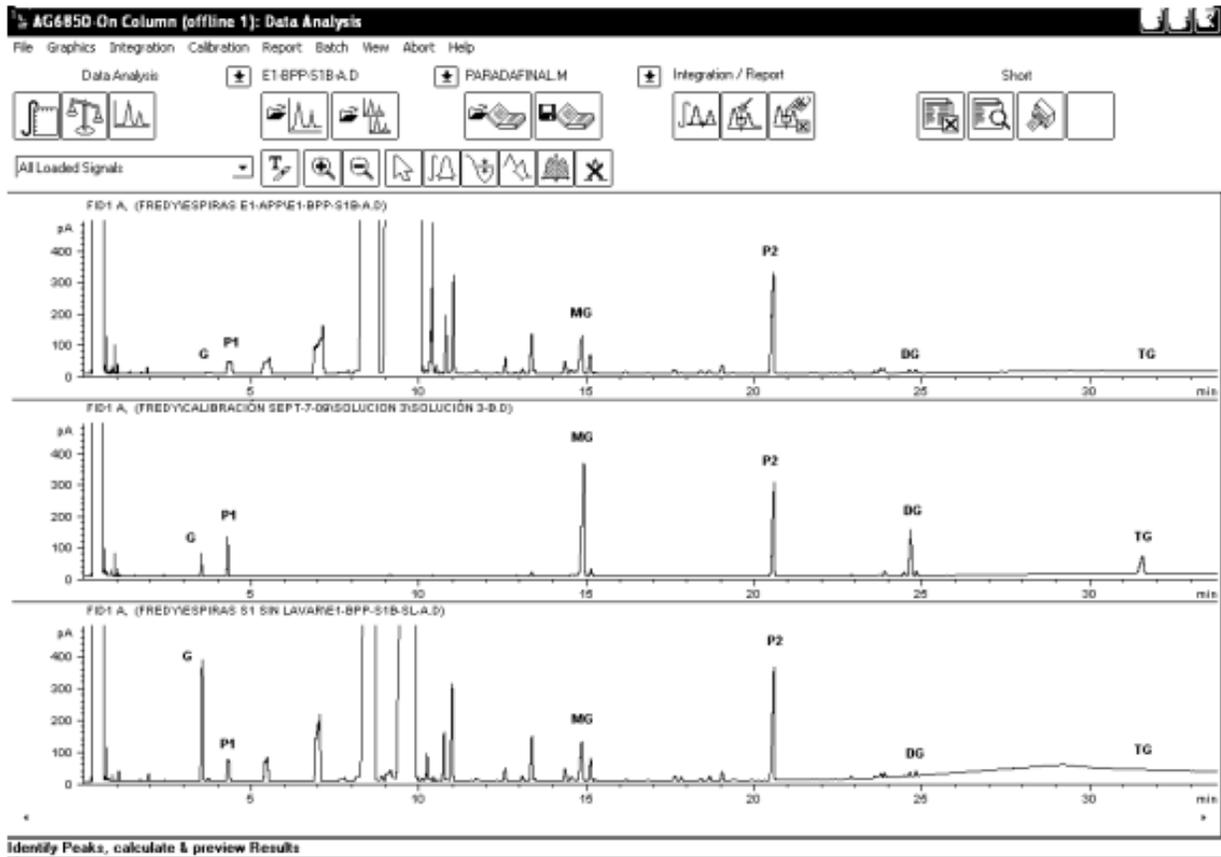
En el campo de los biocombustibles la cromatografía cumple un papel muy importante, pues este es uno de los principales métodos utilizados en la caracterización del biodiésel, un ejemplo de esto se observa en la Figura 18 donde se muestran diferentes cromatogramas que serán posteriormente analizados para obtener la comparación de una muestra de biodiésel pretratado de aceite de palma lavado y otro sin lavar, tomados de la primera salida del reactor helicoidal.

Los cromatogramas inyectados en el CG con columna, se analizaron según la norma UNE EN 14105, involucrando:

1. Una muestra de biodiesel pretratado de palma en la primera salida del reactor helicoidal lavado.
2. Una solución con los patrones de Glicerol, Patrón interno 1, monoglicéridos, Patrón interno 2, diglicéridos y triglicéridos.
3. Una muestra de biodiesel pretratado de palma en la primera salida del reactor helicoidal sin lavar.

Figura 18.

*Cromatograma GC on Column para análisis de biodiésel obtenido de aceite de palma.*



**Nota:** Imagen tomada de Avellaneda Vargas, F. A. (2010).

### BIBLIOGRAFÍA

Abbott, D y Andrews, R. S. (1970). *“Introducción a la Cromatografía”*. Ed. Alhambra, S. A. Madrid.

Adriana Corzo (2019). *Técnicas de Análisis en Química Orgánica – CROMATOGRAFÍA*. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Disponible en: <http://biblioteca.uns.edu.pe/>

Avellaneda Vargas, F. A. (2010). *Producción y caracterización de biodiesel de palma y de aceite reciclado mediante un proceso batch y un proceso continuo con un reactor helicoidal*. Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili.

Brozek, C. M. (1999). *Chromatography*. Journal of Chemical Education, 76(1), 83.

Chilón, E., & Chilón, J. (2014). *Compost altoandino e interacción con harina de rocas y su efecto en las plantas y la fertilidad de suelos*. La Paz, Bolivia: La Ciencia Agro.

Gordillo, F., & Chavez, E. (2011). *Evaluación comparativa de la calidad del compost producido a partir de diferentes combinaciones de desechos agroindustriales azucareros*. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Heredia, C. (2012). *Análisis de un sistema de cromatografía de campo para la evaluación de calidad de suelos y compost en empresas asociadas a ECOFAS*. Sangolquí - Ecuador: Escuela Politécnica del Ejercito.

Lehninger, A; Nelson D. L; Cox, M. M. (2014). "*Principios de Bioquímica*". 6 a Ed. Omega Ediciones S.A., Barcelona.

Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA (2016). *Guía Sobre Principios Básicos De Cromatografía Y Sus Aplicaciones*. Disponible en: <https://repositorio.sena.edu.co/>

Strain, H. H., & Sherma, J. (1967). *M. Tswett: "Adsorption analysis and chromatographic methods: Application to the chemistry of chlorophylls"*. *Journal of Chemical Education*, 44(4), 238.