

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**“DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL EN DISPOSITIVOS
MEDICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado
ante la ilustre Universidad Central de Venezuela
por el bachiller Elvis Ramos Espinoza, para
optar al título de Licenciado en Química,
mención Tecnología.

Tutores: Dr. Luis R. Gómez
Lic. Rafael Golding

Caracas, Abril de 2016

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**“DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL EN DISPOSITIVOS
MEDICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado
ante la ilustre Universidad Central de Venezuela
por el bachiller Elvis Ramos Espinoza, para
optar al título de Licenciado en Química,
mención Tecnología.

Tutores: Dr. Luis R. Gómez
Lic. Rafael Golding

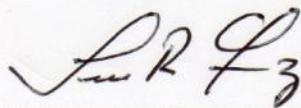
Caracas, Abril de 2016

Profesor Luis R. Gómez, investigador del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Rafael Golding, investigador del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela, certifican que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANALISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL EN DISPOSITIVOS MEDICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”

Presentado por el Br. Elvis Ramos Espinoza, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2014 y 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Abril de 2016



Dr. Luis R. Gómez
(Tutor)



Lic. Rafael Golding
(Tutor)

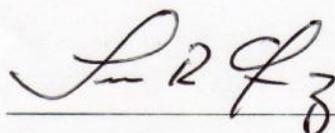
Resumen

Actualmente el método de esterilización más empleado para el tratamiento de dispositivos médicos plásticos como catéteres, es la exposición a agentes esterilizantes gaseosos como el de óxido de etileno. El mismo posee la ventaja de trabajar a bajas temperaturas, lo que resulta significativamente importante porque la mayoría de estos dispositivos médicos son termolábiles, es decir, se destruyen o deforman a una temperatura superior a los 115°C. Sin embargo, el óxido de etileno excedente puede tener efectos adversos sobre la salud humana, de allí que el presente trabajo de investigación está enfocado en el desarrollo de un método de análisis para determinar su concentración residual en dispositivos médicos que estarán en contacto directo con los pacientes.

Se desarrolló un método empleando un sistema acoplado de Headspace y Cromatografía de gases (HS-GC), para la medición de OE. El método desarrollado se utilizó para la determinación de OE residual en muestras de catéteres uretrales de PVC, desarrollando un análisis de la desorción del gas en cuestión sobre muestras esterilizadas, con el paso del tiempo.

Se obtuvo que la concentración de OE residual en las muestras analizadas (sondas Nelaton #10) fue de: 23,8 µg/g para el día 1; 19,2 µg/g para el día 2; 16,6 µg/g para el día 3, 15,4 µg/g para el día 4; 13,8 µg/g para el día 5 y 11,6 µg/g para el día 6. Y que el tiempo de aireación a temperatura ambiente necesario para que este tipo de muestra alcance la concentración de OE máxima permitida para la distribución del material, es de 364 horas, lo que equivale a 15 días.

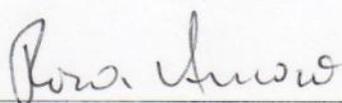
Los abajo firmantes, asignados por la Universidad Central de Venezuela como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANALISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL EN DISPOSITIVOS MEDICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”** presentado por el Br. Elvis Ramos Espinoza, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Dr. Luis Gómez
(Tutor)



Lic. Rafael Golding
(Tutor)



Dr. Rosa Amaro
(Jurado)



MSc. Lola De Lima
(Jurado)

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios, por ser apoyo y fortaleza en los momentos oscuros de este camino, en los momentos en que las dificultades abrumaron y donde flaqueó la voluntad, así como también en los momentos de éxito, de resolución, de felicidad y de claridad. Le agradezco la oportunidad de tener todas las experiencias tanto buenas como malas a lo largo de mi carrera, gracias a los cuales pude desarrollarme y crecer tanto académicamente como personalmente.

Le agradezco a mis padres, por darme la vida, por ser mi mayor y mejor ejemplo a seguir, luchadores incansables, trabajadores, honestos, amorosos, duros cuando hay que serlo; por velar siempre por mi bienestar, por mi educación y por mi felicidad; por ser guías, maestros, confidentes y amigos. Agradezco también a mi hermana, por demostrarme que ser mayor no significa saber más, por quererme, aceptarme y ser un apoyo invaluable. Agradezco a todos por darme la oportunidad de crecer en una familia unida y fuerte sin la cual no estaría donde estoy ahora. Esto es para ustedes y por ustedes.

Agradecimientos especiales a los profesores Luis Gómez, Rafael Golding, Gustavo Pérez y José Chirinos por su formación académica, por sus buenos consejos y apoyo, por darme a conocer en profundidad el mundo de la química analítica y por haber tenido la oportunidad de realizar pasantías en el Centro de Química Analítica, lo que marcó un punto de inflexión tanto en mi carrera como en mi vida.

Agradezco al Ing. Rudolph Leguizamon y a Prontomedica®, por el apoyo, la confianza y toda la ayuda y asistencia brindada.

Finalmente, agradezco a todos y cada uno de los grandes amigos y compañeros que tuve el placer de conocer y con los que tuve el honor de estudiar, no todos son químicos, pero cada uno representó parte importante de mi trayecto en la universidad y compartimos grandes vivencias que jamás olvidaré. Especialmente a Gladys Guaura, Ely Charris y Jhonatan Da Silva, sin su amistad, paciencia, apoyo, motivación y compañía, le habría faltado un matiz fundamental a toda esta experiencia. Gracias.

Índice

1.- Introducción	1
2.- Revisión bibliográfica	3
2.2.- Óxido de etileno	3
2.2.1.- Óxido de etileno como agente esterilizante	5
2.2.2.- Equipos y etapas en la esterilización con óxido de etileno	7
2.2.3.- Variables a controlar en la esterilización con óxido de etileno	10
2.2.4.- Toxicidad del óxido de etileno	12
2.3.- Técnicas cromatográficas	15
2.3.1.- Tipos de cromatografía	15
2.3.2.- Cromatografía de gases	17
2.3.2.1.- Gas portador o de arrastre	18
2.3.2.2.- Sistema de introducción de la muestra	19
2.3.2.2a.- Inyector “Split” (con divisor de flujo)	19
2.3.2.2b.- Inyector “splitless” (sin divisor de flujo)	20
2.3.2.3.- Columnas cromatográficas	21
2.3.2.3a.- Columna capilar	22
2.3.2.3b.- Columna rellena o empacada	23
2.3.2.4.- Fases estacionarias	24

2.3.2.5.- Sistemas de detección	25
2.3.2.5a.- Detector de ionización a la llama (FID)	27
2.4.- Introducción de muestra en Cromatografía de Gases por Headspace (HS, espacio confinado)	29
2.4.1.- Tipos de headspace	29
2.4.2.- Bases teóricas de la introducción de muestras por Headspace	31
2.4.3.- Relaciones fisicoquímicas involucradas	35
2.4.4.- Sensibilidad del headspace	38
2.4.4.1.- Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad del headspace	39
2.4.4.2.- Efecto del volumen confinado de muestra en la sensibilidad del headspace	40
3.- Antecedentes	42
4.- Justificación	63
5.- Objetivos	64
6.- Metodología experimental	65
6.1.- Materiales y equipos	65
6.1.1.- Cromatógrafo de gases	65
6.1.2.- Baño termostático	65

6.1.3.- Viales	66
6.1.4.- Reactivos utilizados	67
6.1.5.- Material de laboratorio	68
6.1.6.- Muestras	68
6.2.- Condiciones cromatográficas preliminares	69
6.3.- Factibilidad de la determinación por HS	74
6.3.1.- Preparación de los patrones de OE y estándar interno	75
6.3.2.- Condiciones de partida para HS	79
6.4.- Optimización del sistema de HS-GC	81
6.4.1.- Condiciones cromatográficas definitivas	82
6.4.2.- Estudio de la precisión de las inyecciones por HS-GC	84
6.4.3.- Condiciones de HS definitivas	86
6.5.- Curva de calibración para OE con THF como estándar interno	91
6.6.- Tratamiento de muestras y cuantificación del OE residual	96
6.6.1.- Estudio del efecto matriz	98
6.6.2.- Desorción del OE residual en la muestra	99
7.- Conclusiones	103
8.- Recomendaciones	106
9.- Bibliografía	107

1.- Introducción

Actualmente, en gran cantidad de procesos hospitalarios se emplean dispositivos o materiales médicos que tendrán contacto directo con los pacientes que serán tratados, materiales como: lentes intraoculares, implantes de pequeños a medianos, prótesis, dispositivos intrauterinos, catéteres, sondas, entre otros materiales que estarán en contacto con sangre, mucosas y/o piel. Por esta razón es indispensable que dicho material esté totalmente libre de organismos infecciosos y bacterias que puedan poner en riesgo la salud de la persona con la que tendrá contacto dicho dispositivo, de allí surge la necesidad de emplear métodos de esterilización para dichos materiales.

Existen diversos métodos de esterilización, su aplicabilidad depende de las propiedades del tipo de material a esterilizar y su clasificación viene dada por el tipo de agente que actúa en el proceso:

- Agentes Físicos:
 - Calor húmedo: como por ejemplo, vapor a presión (autoclaves).
 - Calor seco: aire caliente (horno), incineración.
 - Radiación.

- Agentes Mecánicos:
 - Filtración.

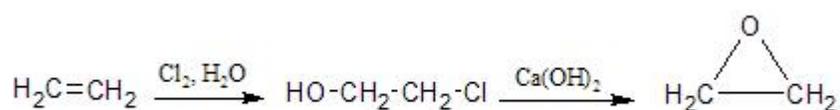
- Agentes Químicos:
 - Gaseosos: Óxido de etileno.
 - No gaseosos: Aldehídos, ácido peracético, peróxido de hidrogeno.

Actualmente el método de esterilización más empleado para el tratamiento de materiales como los antes mencionados, es la exposición a agentes esterilizantes gaseosos como el óxido de etileno. Éste posee la ventaja de trabajar a bajas temperaturas, lo que resulta significativamente importante porque la mayoría de estos dispositivos médicos son termolábiles, es decir, se destruyen o deforman a una temperatura superior a los 115°C. Sin embargo, el óxido de etileno excedente puede tener efectos adversos sobre la salud humana, de allí que el presente trabajo de investigación está enfocado en el desarrollo de un método de análisis para determinar su concentración residual en dispositivos médicos que estarán en contacto directo con los pacientes.^{[1][2][3]}

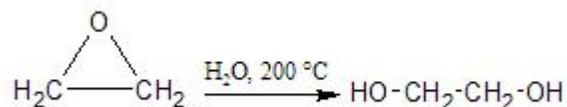
2.- Revisión bibliográfica.

2.2.- Óxido de etileno

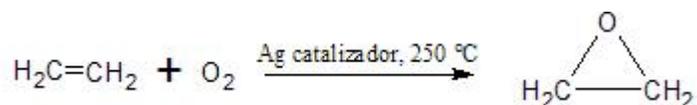
El óxido de etileno (También nombrado OE por sus iniciales en español) es el compuesto más sencillo de la familia de epóxidos (éteres cíclicos de tres miembros, también llamados oxiranos), es un gas incoloro, inflamable y tóxico que históricamente se ha obtenido por dos principales procesos: en el más antiguo se pasaba etileno y cloro gas por una columna de absorción en contracorriente con un chorro de agua pulverizada, luego por destilación se separa una solución de etilenclorhidrina que se calienta a 100°C con hidróxido de calcio en exceso para formar el epóxido, como se muestra en la siguiente reacción:



Luego se separa por destilación de los subproductos de reacción (cloruro de etileno, etilenglicol y éter betacloroetílico), donde el etilenglicol es el subproducto formado en mayor cantidad, de la siguiente forma:



En el proceso más usado actualmente, el etileno es oxidado directamente en presencia de oxígeno o de aire y empleando un catalizador de plata:



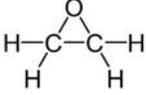
El óxido de etileno es miscible en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos y a partir de concentraciones de 3% v/v en el aire es inflamable, además, su poder reactivo

es muy elevado y por la labilidad del enlace epóxido es muy empleado como agente alquilante, uniéndose a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhídricos, hidroxilos, entre otros. En estado líquido polimeriza fácilmente y esta reacción es fuertemente exotérmica incluso explosiva. La polimerización puede acelerarse por acción directa de la luz o reactivos como: potasio, cloruro de hierro, de estaño, de zinc y aluminio, óxidos de hierro y aluminio, entre otros; con el catalizador adecuado puede dimerizar para obtener 1,4-dioxano, dímero del óxido de etileno y diéter cíclico del etilenglicol, que se emplea como disolvente de muchos compuestos orgánicos e inorgánicos.

Su descomposición térmica da lugar a la formación de diversos compuestos como: acetaldehído, óxidos de carbono, metano, etano, propano e hidrógeno. Reacciona fácilmente con cloro para formar etilenclorhídrica, así como con agua y con soluciones acuosas para formar etilenglicol. Industrialmente el óxido de etileno se procesa para obtener una numerosa cantidad de derivados con múltiples aplicaciones: glicoles y poliglicoles para fabricación de refrigerantes, polioles para la fabricación de espumas, etilenglicol (MEG) para producir fibras como poliéster, explosivos y anticongelantes; dietilenglicol (DEG) y trietilenglicol (TEG) también empleados en la fabricación de explosivos y anticongelantes. ^[6]

Un diagrama de las propiedades físico-químicas del óxido de etileno se muestra en la tabla 1. ^{[4][5]}

Tabla 1.- Propiedades del óxido de etileno

Propiedad	Valor
Formula molecular	
Punto de ebullición a presión atmosférica	10,5 °C (rango 10,4 °C - 10,7 °C)
Punto de fusión	-111,3 °C
Punto de inflamación (vaso cerrado)	< -18 °C
Densidad (líquido) a 0 °C	890 kg/m ³
Densidad de vapor (aire = 1)	1,52
Calor de evaporación	578 kJ/kg a presión atmosférica y 10,5 °C
Calor específico - líquido	1,97 kJ/kg °C a 11 °C 2,00 kJ/kg °C a 20 °C
Calor específico - gas	1,06 kJ/kg °C a 25 °C.
Calor de polimerización	2093 kJ/kg
Calor de descomposición del gas	83700 kJ/kg mol
Calor de combustión	27649 kJ/kg
Conductividad eléctrica del líquido puro	410 S/m
Energía mínima de ignición a 1 bar y 25 °C en aire	0,06 mJ
Punto de fusión del hidrato	11°C (máximo a 30% de OE)
Temperatura de autoignición	429 °C
Temperatura de autodescomposición	560 °C
Olor del OE puro	Se percibe a 500 – 700 ppm, aprox. Puede producirse adaptación

2.2.1.- Óxido de etileno como agente esterilizante

El óxido de etileno es calificado como agente microbiano de amplio espectro que destruye de manera rápida y eficiente las bacterias en estado vegetativo, incluyendo al bacilo de la tuberculosis, a las esporas y los virus. ^[7]

Por lo general, en las células bacterianas, se encuentran tres sitios fundamentales para la vida del microorganismo que son susceptibles a los ataques químicos: las enzimas, las capas superficiales y el material nuclear. Las proteínas enzimáticas poseen un cierto número de grupos reactivos esenciales para su actividad, entre estos grupos se encuentran los grupos ácidos y básicos de las nucleoproteínas, como lo son los grupos amino, carboxilo, imino, hidroxilo, sulfhídrico, entre otros, y es sobre los átomos de hidrógeno lábiles de estos grupos que actúa el óxido de etileno, alquilándolos por radicales hidroxietilos en un proceso que es lento y determinante en la muerte del microorganismo. Dicho proceso se ilustra en la figura 1.

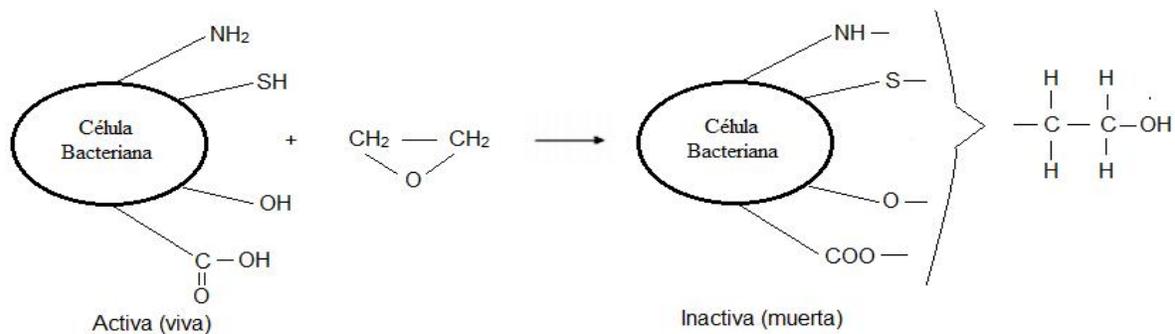


Figura 1.- Mecanismo de acción del OE

El uso del óxido de etileno como agente esterilizante se ve justificado por su gran permeabilidad y poder de penetración y difusión, por ser un potente bactericida desactivador de microorganismos, patógenos o no; por una relación costo – proceso que permite re-esterilizar elementos que de otro modo deberían ser descartados y por la posibilidad de trabajar a bajas temperaturas. [2][8]

2.2.2.- Equipos y etapas en la esterilización con óxido de etileno

La esterilización es el proceso mediante el cual se destruye o se desactiva el total de los microorganismos bacterianos presentes en un material determinado. Éste proceso ha sido de enorme utilidad a nivel farmacéutico y médico por la necesidad de emplear tanto equipos médicos como materiales quirúrgicos libres de bacterias para evitar infecciones en los pacientes que tendrán contacto directo con los mismos. [3]

El tipo de equipo que debe emplearse para la esterilización con óxido de etileno consiste en una cámara esterilizadora completamente hermética, con controles programables para el ciclo completo del proceso de esterilización, incluyendo un sistema de presión negativa (vacío), que permita la evacuación total del gas remanente hacia el exterior del ambiente de trabajo una vez que termine el ciclo. El tiempo de exposición y controles de temperatura y humedad se fijan después de cargar el esterilizador y son controlados automáticamente durante el ciclo. [7]

El proceso de esterilización se lleva a cabo bajo el siguiente número de etapas:

- **Pre- acondicionamiento:** La humedad del material a esterilizar debe ser homogeneizada y nivelada antes de ser expuesto al gas, ya que el óxido de etileno no destruirá de forma eficaz los microorganismos que se encuentren alojados en el seno de la materia orgánica deshidratada; tampoco destruiría esporas que se hubiesen desecado por exposición a una atmósfera con humedad relativa inferior al 30%. Es por esto que todos los objetos que serán expuestos al gas deben ser lavados cuidadosamente para eliminar restos de materia orgánica. Los dispositivos plásticos o de superficie dura son previamente

tratados con ciclos combinados de lavado y remojado en agua durante una hora, luego son secados empleando aire comprimido filtrado e inmediatamente colocados en la cámara. Este paso aporta la humedad requerida para llevar a cabo la reacción de los microorganismos con el agente esterilizador. Siempre debe mantenerse las tuberías completamente libres de agua remanente del proceso de lavado para evitar que este resto proteja algún vestigio de vida microbiana.

- **Programación:** Se escoge el programa adecuado para la carga que se va a procesar; dicho programa consta de parámetros preestablecidos como tiempo, temperatura, humedad y concentración del gas, que son necesarios para el desarrollo del ciclo. También se realiza una verificación del ingreso del agua que se utiliza para la humidificación. Aquí se controla el contenido de los cilindros o se coloca el cartucho correspondiente para el comienzo del ciclo, dependiendo del sistema de inyección del gas.
- **Acondicionamiento:** una vez colocada la carga, comenzado el ciclo y evacuado el aire se homogeniza la temperatura y la humedad en la carga considerando que la totalidad de la misma no debe superar el 80% del volumen de la cámara, a fin de permitir la circulación del gas por toda la superficie del material. En esta etapa ocurren tres subprocesos, que son:
 - **Evacuación del aire:** Mediante una bomba de vacío se extrae el mayor volumen de aire de la cámara de esterilización, empleando el envoltorio adecuado que permita la salida de aire desde el interior de los paquetes, la permeabilidad del agente esterilizante, que tenga resistencia bacteriana y a la tensión mecánica y que soporte las temperaturas a las que será sometido durante el ciclo.

- **Calentamiento:** Mediante una resistencia eléctrica se lleva la cámara y el material contenido dentro de la misma hasta la temperatura programada para el ciclo.
- **Humidificación:** Para que la interacción entre el agente esterilizante y los microorganismos sea eficaz, debe adaptarse la humedad de la cámara al material a procesar, ya que al realizar el vacío y calentamiento, la humedad previa disminuye y el material se encuentra prácticamente seco.
- **Inyección del gas esterilizante:** si se emplea óxido de etileno puro se trabaja a presión negativa dentro de la cámara de exposición, éste puede ser provisto por cilindros o cartuchos de dosis única. Estos cartuchos se perforan una vez que se ha obtenido la temperatura deseada, humedad requerida y se ha producido el vacío de la cámara. Si se utiliza óxido de etileno diluido con otro gas, es necesario inyectar una mayor cantidad de gas mezcla para alcanzar la concentración deseada, por lo que se trabaja a presión positiva dentro de la cámara. El gas debe ingresar en la cámara luego de pasar por un dispositivo de vaporización y calentamiento para que no entre óxido de etileno líquido que cambie la humedad de los materiales por enfriamiento y para evitar estratificación de concentraciones diferentes en la cámara.
- **Exposición al gas esterilizante:** el tiempo de exposición fijado en el programa, se empieza a descontar una vez que las condiciones de la cámara están establecidas y comienza la propagación del gas dentro de la cámara. Transcurrido este tiempo, el agente esterilizante es evacuado de la cámara de exposición y de carga.
- **Evacuación del gas esterilizante:** los gases contenidos en la cámara son sacados al exterior por medio de una bomba con cierre mecánico, para ser

finalmente conducido al exterior por medio de cañerías herméticas, ventilándose en área segura mediante burbujeo en agua o por venteo. La eliminación consiste en suministrar y evacuar de la cámara, alternadamente, aire filtrado o gas inerte. Este procedimiento se realiza 20 veces como mínimo, para extraer la mayor cantidad de gas residual posible.

- **Ventilación:** ésta etapa ocurre dentro de la cámara del esterilizador, a una temperatura menor a la del proceso para no dañar los artículos sensibles al calor, y es donde se elimina el óxido de etileno y sus productos de reacción hasta alcanzar niveles seguros.
- **Aireación:** En este paso se produce la desorción del gas del material expuesto y del envoltorio en sí. Se realiza en cabinas de aireación especiales o en el depósito de material estéril. El tiempo de aireación y la temperatura empleada tienen una relación importante, notándose que a menores temperaturas mayores tiempos de aireación se requieren. Ésta etapa del proceso debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible y tomando las precauciones necesarias para minimizar el riesgo de exposición de parte de los operadores durante la transferencia. El tiempo de aireación también dependerá de la composición, forma, densidad y peso de los artículos, de la concentración del gas, del tipo de empaque empleado, de la forma de distribución de la carga y de las condiciones de esterilización adoptadas. ^{[7][8][9]}

2.2.3.- Variables a controlar en la esterilización con óxido de etileno

Aquí están descritos los diferentes rangos y valores de los parámetros críticos para programar el ciclo de esterilización:

- Humedad: Debe mantenerse en un rango de 25 % a 50 % para mayor efectividad.
- Temperatura: En general se mantiene en un rango de 25 °C a 65 °C.
- Concentración: Este parámetro se considera efectivo cuando se trabaja dentro de un margen de 350 a 1200 mg por litro de espacio en la cámara.
- Período de exposición: esto depende de la temperatura y la concentración de gas empleada, por lo general oscila entre 2 y 8 horas. [7]

El proceso de aireación es uno de los pasos más críticos e importantes de la esterilización con óxido de etileno, ya que aparte de su gran capacidad de penetración, este gas también se absorbe en algunos de los materiales que son esterilizados. Según la norma COVENIN 2843-91, la cantidad de óxido de etileno absorbida depende del tipo de material. Los datos específicos se muestran en la tabla 2. Los materiales como el metal o el cristal no absorben el óxido de etileno y por lo tanto requieren una aireación posterior menor mientras que materiales como el plástico, gomas, PVC, muselina y papel, si absorben óxido de etileno en diferentes grados y son estos materiales los que requieren un proceso de aireación más específico.

Tabla 2.- Absorción de óxido de etileno por diferentes materiales plásticos o gomas

Material	Rango de absorción (ppm)
P.V.C	10000 - 30000
Poliestireno	15000 - 25000
Polietileno	5000 - 10000
Polipropileno	15000
Goma natural	20000 - 35000
Goma sintética	20000
Goma de silicona	15000 - 20000

La relación que ofrece el tiempo necesario para la aireación de ciertos materiales con respecto a la temperatura también es descrita en esta norma y compara los tiempos necesarios para airear los materiales a temperatura ambiente y en cabina de aireación donde se lleva a cabo un control de temperatura, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.- Influencia de la temperatura: comparación entre el tiempo necesario de aireación a temperatura ambiente y cabina de aireación.

Material	Temperatura ambiente	Cabina de aireación
Papel	24 horas	2 horas
Goma natural	48 horas	4 horas
Polietileno	24 horas	2 horas
Tubos de P.V.C	7 días	8 horas
Tubos de látex	48 horas	4 horas

2.2.4.- Toxicidad del óxido de etileno

La importancia del proceso de aireación y retirado del óxido de etileno absorbido por los materiales, está en que el mismo es considerado como un compuesto altamente tóxico y nocivo para la salud. Según la norma COVENIN 2253 el óxido de etileno es un compuesto de tipo A2, lo que significa que es un supuesto cancerígeno en humanos que ha probado ser cancerígeno en experimentos con animales a niveles de dosis por ruta de administración y situaciones de tipo histológico o por mecanismos que son considerados relevantes en trabajadores expuestos. Además presenta una concentración ambiental permisible (CAP) de 1 ppm/8 horas y un límite de exposición breve (LEB) de 2 ppm/ 15 minutos.

Entre los síntomas que puede provocar en personas expuestas de manera breve y en altas concentraciones están: náuseas, letargo, vómitos, dolores abdominales, diarrea,

irritación de nariz, garganta y ojos, inflamación de la córnea, tos, respiración cortada, edema pulmonar, cianosis, dolores de cabeza, mareos, síncope, disminución del nivel de conciencia, apraxia de las funciones motoras, ataxia, quemaduras químicas, entre otros. Entre los efectos crónicos a la salud se cuentan polineuropatía sensorial y motora, pérdida de reflejos distales, pérdida sensorial, fasciculación, pérdida de coordinación, neuropatía craneal, dificultades cognoscitivas, cataratas, leucemia, abortos espontáneos, aumento de ataques cardíacos e infarto, anemia, entre otros. [7]

A raíz de todo esto es de notar que el uso inapropiado del óxido de etileno como agente esterilizante representa un riesgo para los pacientes, así como al personal que está involucrado en el procedimiento y manejo de productos con óxido de etileno. De ahí que se establecieran límites para las cantidades permisibles de óxido de etileno residual en objetos de aplicación médica, como se ilustra en las tablas 4 y 5.

Tabla 4.- Óxido de etileno residual (nacional)

Objeto de aplicación	Partes por millón de óxido de etileno
Implantes pequeños (10 gramos)	0
Implantes medianos (10-100 gramos)	0
Implantes grandes (100 gramos)	0
Lentes intraoculares	0
En contacto con las mucosas	5
En contacto con la sangre	0
En contacto con la piel	5

Tabla 5.- Límites máximos de residuales de óxido de etileno propuestos (internacional)

Dispositivo	Partes por millón de óxido de etileno
Implantes pequeños (10 gramos)	250
Implantes medianos (10-100 gramos)	100
Implantes grandes (100 gramos)	25
Intrauterinos	5
Lentes intraoculares	25
En contacto con las mucosas	250
En contacto con la sangre	25
En contacto con la piel	250
Esponjas de cirugía	25

Una de las desventajas de su uso como esterilizante es que como consecuencia del proceso de esterilización, quedan absorbidas cantidades residuales del óxido y la presencia de trazas de este compuesto puede provocar efectos adversos al ponerse en contacto con la sangre y tejidos de los pacientes, así como del personal que los utiliza. [7][10][11]

Debido a todo lo dicho anteriormente, es necesario saber exactamente qué cantidad del óxido reside en el material luego de haber sido esterilizado, para asegurar que tanto el uso del proceso de esterilización como de los materiales esterilizados sea efectivo y no presente riesgos a la salud de quienes los utilizarán, con esto en mente, se plantea el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar de manera confiable el óxido de etileno residual en los equipos médicos esterilizados. Las determinaciones analíticas de óxido de etileno se realizan generalmente empleando técnicas cromatográficas.

2.3.- Técnicas cromatográficas

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, cosa que en muchas ocasiones resulta imposible de realizar por otros medios. En las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza por medio de una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Ésta fase móvil pasa a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que está fijada a una columna o superficie sólida. Estas fases son seleccionadas de manera tal que los analitos se distribuyan de modo distinto entre ambas. Los componentes que son fuertemente retenidos en la fase estacionaria, se mueven de manera más lenta con el flujo de la fase móvil en comparación a los que se unen débilmente a la fase estacionaria, que se desplazan con rapidez. A consecuencia de estas diferencias de movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden ser analizadas cualitativa y/o cuantitativamente.

2.3.1.- Tipos de cromatografía

Existen diversas maneras de categorizar los tipos de cromatografía que existen, pero aquí se destacan dos de los más comunes. La primera se basa en la manera en la que están dispuestas las fase móvil y estacionaria y la forma en que entran en contacto. De esta clasificación surgen dos tipos de cromatografía: La cromatografía por **elución en columna**, en la que la fase estacionaria está contenida en un tubo estrecho a través del cual pasa la fase móvil. La cromatografía **en plano**, en la que la fase estacionaria esta fija sobre una placa plana o en los intersticios de un papel, aquí la fase móvil se desplaza por capilaridad o por gravedad.

La segunda clasificación es más específica y fundamental y se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria y en los equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Las tres clases generales deben su nombre al estado de agregación de la fase móvil para cada caso y están representadas en las tablas 6,7 y 8.

Tabla 6.- Cromatografía de líquidos:

Fase móvil	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Líquida	Líquido-líquido o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión

Tabla 7.- Cromatografía de gases:

Fase móvil	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Gas	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el gas y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción

Tabla 8.- Cromatografía de fluidos supercríticos

Fase móvil	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Fluido supercrítico	-	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

Cada una de estas técnicas presenta diversas ventajas y limitaciones con respecto a las otras y por esto compiten entre sí, sin embargo, debido al bajo punto de ebullición y alta volatilidad del óxido de etileno, así como lo sencillo, económico y versátil de la cromatografía de gases, se decide trabajar empleando dicha técnica, por lo cual se hará énfasis en la misma. ^{[12][13]}

2.3.2.- Cromatografía de gases

En cromatografía de gases la muestra, en forma gaseosa o líquida térmicamente estable, se inyecta a través de un septum (diafragma de silicona) y entra a una cámara a temperatura alta donde es volatilizada y homogenizada rápidamente y arrastrada por un gas portador al interior de la columna, donde está contenida la fase estacionaria y donde se produce la separación cromatográfica de los analitos en función de la interacción de los mismos con la fase estacionaria a una temperatura dada, la cual debe ser lo suficientemente alta como para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable. Después de separados, los analitos pasan por un detector que como respuesta envía una señal transitoria, que aparece en la pantalla de un computador o registrador y cuya forma es aproximada a una banda gaussiana. La selectividad en la retención viene determinada por la naturaleza de la fase estacionaria, el flujo de la fase móvil, longitud y diámetro de la columna. ^[13]

A continuación se describen brevemente los componentes principales de un equipo de cromatografía de gases:

2.3.2.1.- Gas portador o de arrastre

El gas de arrastre funge como la fase móvil en la separación cromatográfica, transportando los analitos y haciéndolos pasar a través de la columna de separación donde ocurre la interacción de los mismos con la fase estacionaria. Luego de esto el gas de arrastre es quien dirige los analitos hacia el detector, posterior a su interacción con la fase estacionaria.

En cromatografía de gases se emplean gases inertes para cumplir como fase móvil; los más empleados comúnmente son Argón (Ar), helio (He), hidrógeno (H₂) y nitrógeno (N₂). La selección del gas a emplear depende de los coeficientes de difusión de los analitos ($B_M/u = 2\gamma D_M/u$, en la ecuación de van Deemter) y en algunos casos del detector. ^[12]

Como la fase móvil no interacciona fisicoquímicamente con los analitos en la muestra al ser esta un gas inerte, no debería verse afectada la selectividad en la separación por no influir en la interacción de la muestra con el analito. Sin embargo, la naturaleza del gas portador define la difusión del analito en la fase móvil. Esto afecta las velocidades de flujo óptimas de la fase móvil y por ende los anchos de banda. La elección del gas portador también se ve determinada en gran cantidad de ocasiones por la naturaleza del sistema de detección empleado. Por último el control de velocidad de la fase móvil dentro de la columna es una variable muy importante y determinante en el proceso de

separación, por lo que el control del mismo se debe llevar a través de válvulas de control muy fino. ^[13]

2.3.2.2.- Sistema de introducción de la muestra

La herramienta empleada para introducir la muestra en el equipo de cromatografía es una microjeringa para líquidos o para gases, esta jeringa debe tener una punta penetrante para poder atravesar el septum o diafragma de silicona que anteceda a la cámara de volatilización. La muestra debe ser introducida a la columna como un paquete compacto o tapón de vapor para evitar que se produzcan ensanchamientos de las bandas y por ende malas resoluciones, por esto la muestra entra a una cámara de vaporización instantánea, a alta temperatura (generalmente 50°C más que la temperatura de ebullición del compuesto más volátil en la muestra), luego de esto es inmediatamente arrastrada por el gas portador e introducida a la columna. Existen diversas configuraciones para el puerto de inyección y que definen la forma en que la muestra es transferida a la columna así como la cantidad de la misma que es introducida. Aquí se mencionarán los dos tipos más importantes empleados en esta técnica:

2.3.2.2a.- Inyector “Split” (con divisor de flujo)

En este tipo de inyector solo una fracción de la muestra ingresa a la columna y la mayor parte de la misma es desechada por una purga. Este sistema es el más adecuado para trabajar con columnas capilares, ya que las mismas soportan un volumen de muestra muy pequeño y también resulta útil para trabajar con muestras muy concentradas, para

evitar saturación tanto de la columna como de la señal recibida por el detector. Además, esta configuración permite un corto tiempo de residencia de la muestra en la cámara de inyección, lo que quiere decir que gracias a la alta velocidad inicial se introduce un pulso compacto de muestra a la columna. El sistema de división de flujo está ubicado al final de la cámara de inyección, tal como se muestra en la figura 2:

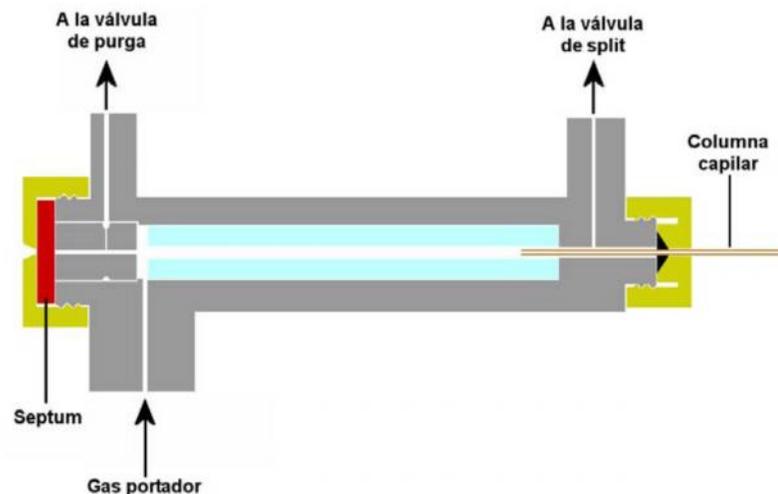


Figura 2.- Sistema de inyección con split.

Entre las desventajas que presenta este método se encuentra que no es apropiado para el análisis de trazas en muchos casos y que presenta límites de detección mayores con respecto al sistema splitless. ^{[12][14]}

2.3.2.2b.- Inyector “splitless” (sin divisor de flujo)

Este sistema de inyección funciona básicamente de la misma forma que el anterior con la diferencia que este no tiene válvula de división o la misma se encuentra cerrada al

momento de la inyección, debido a esto, lo que ingresa a la columna es la totalidad de la muestra inyectada en adición al gas portador que la lleva. En este sistema la válvula divisional puede ser utilizada luego de inyectada la muestra e ingresada a la columna (10 a 40 segundos luego de la inyección aproximadamente), para realizar una purga de la cámara. Como ventaja ante el sistema splitless está que se pueden realizar determinaciones a nivel de trazas, además, esta configuración puede ser empleada para trabajar con columnas empacadas y con columnas capilares de alto calibre; la reproducibilidad de las áreas de las bandas es comparable a la otorgada por el sistema con split. Por último, cuando se emplea esta configuración la degradación térmica es más pronunciada al existir mayores tiempos de residencia de la muestra en la cámara de vaporización caliente. ^[13]

2.3.2.3.- Columnas cromatográficas

En cromatografía de gases se emplean dos tipos generales de columna, las rellenas o empacadas, y las tubulares abiertas o capilares. El tamaño de las columnas cromatográficas varía desde menos de 2 m hasta 50 m de longitud, o más. Ellas pueden ser construidas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundido o teflón y en general se configuran como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm a fin de colocarlas dentro de un horno termostatzado.

Una variable sumamente importante a controlar para un trabajo preciso es la temperatura de la columna, que se regula a las décimas de grado colocando la columna dentro de un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y el grado de separación requerido. En la práctica se obtienen tiempos de elución razonables (entre 2 y 30 min) con temperaturas

iguales o ligeramente superiores al punto de ebullición promedio de la muestra. Para muestras con intervalos de punto de ebullición muy amplios, resulta conveniente emplear programación de temperatura, es decir, se aumenta la temperatura de la columna continuamente o por etapas a medida que se produce la separación. A continuación se describen los dos tipos de columnas cromatográficas.

2.3.2.3a.- Columna capilar

Este tipo de columnas son las más largas y estrechas; son fabricadas de sílice fundida y cubiertas con poliimida (un plástico capaz de resistir 350°C), como soporte y protección contra la humedad atmosférica. Los diámetros internos típicos son entre 0,1 y 0,53 mm y las longitudes típicas de 15 a 100 m. Las columnas con un diámetro interno de 530 µm se denominan normalmente "Megabore", y aquellas con diámetros menores a 100 µm se llaman "Microbores". Las megabore soportan mayor cantidad de muestra que las microbore, estas cantidades son comparables a las que soportan las columnas empacadas, pero las capilares son significativamente más eficientes que estas. Las columnas estrechas dan mayores resoluciones que las columnas anchas pero requieren una presión de trabajo mayor y la capacidad de muestra es reducida. Este tipo de columna otorga una mejor resolución, mayor rapidez y mayor sensibilidad en el análisis que las columnas empacadas, aunque tienen una menor capacidad de muestra.

Las columnas capilares se presentan en dos tipos básicos: columna abierta de pared recubierta (WCOT) y columna abierta recubierta con soporte (SCOT). Las columnas abiertas de pared recubierta son capilares con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria. En las columnas abiertas con soporte recubierto, la

superficie interna del capilar está revestida de una capa delgada (30 μ m aproximadamente) de un material de soporte, como tierras diatomeas. Este tipo de columna contiene varias veces la fase estacionaria que contiene una columna de pared recubierta y, por tanto, tienen una mayor capacidad de carga. Generalmente la eficacia de una columna SCOT es menor que la de una columna WCOT, pero es sensiblemente mayor que la de una columna rellena.

2.3.2.3b.- Columna rellena o empacada

Las columnas empacadas actualmente se fabrican con tubo de vidrio, metal (acero inoxidable, cobre, aluminio), o de teflón, con una longitud característica de 2 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm. Estos tubos se rellenan densamente con un material de relleno, también llamado soporte sólido, finamente dividido y homogéneo, que se recubre con una delgada capa (0,05 a 1 μ m) de fase estacionaria líquida. Estos tubos también se disponen de manera helicoidal para poder colocarlos dentro de un horno termostatzado, estos, con un diámetro de unos 15 cm.

El soporte sólido en una columna empacada sirve para retener la fase estacionaria líquida, de manera tal que exista la mayor superficie de contacto con la fase móvil. El soporte ideal consiste en partículas esféricas, pequeñas y uniformes con una buena resistencia mecánica y una superficie específica de al menos 1 m²/g. Además, el material debería ser inerte a altas temperaturas, y poder humectarse homogéneamente con la fase líquida. Todavía no se cuenta con un material que cumpla la totalidad de estas características, pero el más utilizado actualmente es preparado a partir de tierras de diatomeas de procedencia natural, que están constituidas por esqueletos de miles de especies de plantas unicelulares que habitaban antiguos mares y lagos. Estas

plantas tomaban sus nutrientes y eliminaban sus residuos por difusión molecular a través de sus poros; como consecuencia sus restos resultan adecuados como material de soporte ya que ese tipo de difusión molecular se asemeja a la que fundamenta a la cromatografía de gases. ^{[12][13][15]}

2.3.2.4.- Fases estacionarias

Todas las moléculas relativas a un compuesto específico recorren la columna aproximadamente a la misma velocidad y se muestran como una banda de moléculas (conocida como banda de muestra). La velocidad a la que cada banda de muestra avanza por la columna depende de la estructura del compuesto, la estructura química de la fase estacionaria y la temperatura de columna. Del mismo modo, la anchura de la banda de muestra, depende de las condiciones de funcionamiento y de la dimensión de la columna. Las propiedades ideales para una fase líquida inmovilizada en una cromatografía gas-líquido son: baja volatilidad, idealmente el punto de ebullición del líquido debe ser al menos 100°C mayor que la temperatura de trabajo máxima de la columna; estabilidad térmica; químicamente inerte; características de solvente tales que los valores del factor de capacidad y selectividad de los solutos a resolver estén dentro de un intervalo conveniente.

Para que una especie tenga un tiempo de residencia razonable en la columna, debe presentar cierto grado de compatibilidad (solubilidad) con la fase estacionaria. Aquí se aplica el principio de “lo semejante disuelve a lo semejante”, donde semejante se refiere a las polaridades del soluto y del líquido inmovilizado. Las columnas de polaridad intermedia (éteres, cetonas, aldehídos), son las mejores para solutos de polaridad intermedia; las muy polares (poliéster, alcoholes, ácidos, aminas) para solutos de

polaridad alta, y de esta forma, fases apolares (hidrocarburos saturados, dialquilsiloxanos), para solutos apolares. Cuando esta igualdad se cumple, el orden de elución viene dado por el punto de ebullición de los compuestos a eluir. En la tabla 9 se mencionan algunas fases estacionarias de uso común en la cromatografía de gases. ^[12]

Tabla 9.- Fases estacionarias de uso común en cromatografía de gases

Fase estacionaria	Nombre comercial	Temperatura máxima (°C)	Aplicaciones comunes
Polidimetilsiloxano	OV-1, SE-30	350	Fase estacionaria no polar de uso general; hidrocarburos, aromáticos polinucleares, fármacos, esteroides, PCB
Poli(fenilmetildimetil)siloxano (10 por 100 fenil)	OV-3, SE-52	350	Ésteres metílicos de ácidos grasos; alcaloides; fármacos; compuestos halogenados
Poli(fenilmetil)siloxano (50 por 100 fenil)	OV-17	250	Fármacos, esteroides, pesticidas, glicoles
Poli(trifluoropropildimetil)siloxano	OV-210	200	Aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos
Polietilenglicol	Carbowax 20M	250	Ácidos libres, alcoholes, éteres, aceites esenciales; glicoles
Poli(dicianoalildimetil)siloxano	OV-275	240	Ácidos grasos poliinsaturados, ácidos de la colofonia, ácidos libres, alcoholes

2.3.2.5.- Sistemas de detección

Luego de que los analitos pasan por la columna, debe haber a la salida de esta, un sistema de detección, que señale la salida de un componente de la muestra y ofrezca, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través

de él. Un detector ideal para cromatografía de gases debería cumplir con las siguientes características:

- Sensibilidad adecuada ante la cantidad de soluto que lo atraviesa (aproximadamente 10^{-15} a 10^{-8} g de soluto /s).
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Respuesta lineal para los solutos extendida a varios ordenes de magnitud.
- Intervalo de temperatura de trabajo comprendido entre la temperatura ambiente hasta al menos 400 °C.
- Tiempo de respuesta corto e independiente del caudal.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo.
- Respuesta semejante para todos los solutos o, por el contrario, una respuesta altamente selectiva y predecible para uno o más tipos de solutos.
- No destructivo de la muestra.

Actualmente no existe un detector que cumpla con todas estas características y es probable que dicho detector no pueda diseñarse nunca.

Los detectores que se encuentran disponibles para cromatografía de gases pueden ser divididos de forma genérica en detectores universales y detectores específicos; los primeros ofrecen la ventaja de responder prácticamente ante cualquier compuesto que pueda eluir de la columna, sin embargo, esta misma propiedad puede convertirse en un inconveniente cuando se procede al análisis de mezclas muy complejas; en este último caso, la utilización de detectores específicos resulta muy ventajosa, ya que al responder únicamente frente a un grupo limitado de compuestos, los cromatogramas que ofrecen resultan muy simplificados.

Los detectores en cromatografía de gases son de tipo diferencial, quiere decir que no ofrecen señal cuando solamente pasa por ellos el gas portador, pero si responden ante alguna propiedad que pueda variar cuando éste se encuentra mezclado con alguna sustancia eluída de la columna. Entre los detectores más comunes y las propiedades en las que se basa su funcionamiento están: **el detector de conductividad térmica (TCD)**, que mide los cambios en la conductividad térmica de la corriente de gas ocasionado por el paso de moléculas de analito, es sencillo, de respuesta universal, tiene amplio rango dinámico lineal y es no destructivo de la muestra pero es poco sensible por lo que no se puede utilizar cuando se emplean columnas capilares, por el pequeño tamaño de muestra utilizado; **detector de captura de electrones (ECD)**, que es muy selectivo para compuestos conteniendo halógenos y para grupos funcionales electronegativos, son altamente sensibles y no alteran la muestra, pero no es sensible a grupos como aminas, alcoholes, hidrocarburos y su respuesta en general es no lineal; **detector de ionización a la llama (FID)**, que es un detector universal y uno de los más empleados en cromatografía de gases, al ser el detector ideal para la determinación del óxido de etileno se profundizará más en sus características a continuación.

2.3.2.5a.- Detector de ionización a la llama (FID)

Es un detector extensamente utilizado y uno de los más aplicables en cromatografía de gases. En un quemador se mezcla el eluyente de la columna con hidrógeno y aire para luego encenderse eléctricamente, un esquema general para este tipo de detector se muestra en la figura 3. Los átomos de carbono (excepto carbonilos y carboxilos) producen radicales CH, que al parecer producen iones CHO^+ ; solo uno de 10^5 átomos de carbono produce un ión, pero la producción de iones es estrictamente proporcional al número de átomos de carbono susceptibles de ionizarse que penetran en la llama. Cuando se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, la

corriente que resulta (aproximadamente 10^{-12} A) se dirige hacia un amplificador operacional de alta impedancia y esta es la señal que da el detector.

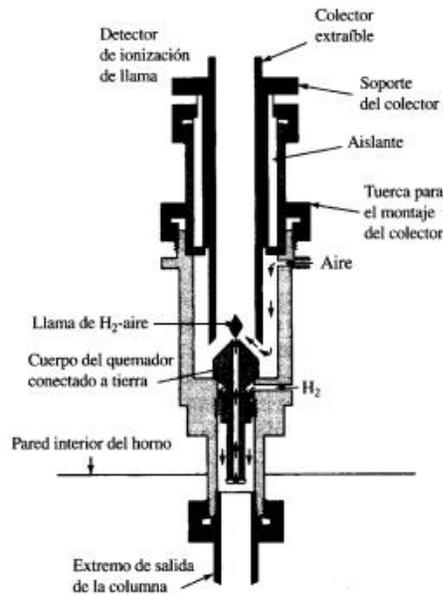


Figura 3.- Detector FID

Este detector es insensible a los gases no combustibles como H₂O, CO₂, SO₂, y NO_x, esto le permite analizar muestras orgánicas que puedan estar contaminadas con agua y muestras naturales de agua para detección de contaminantes. También posee una alta sensibilidad (10^{-13} g/s), un gran intervalo de respuesta lineal (10^7), y un bajo ruido, pero una de sus desventajas es que es destructivo de la muestra. ^{[12][13]}.

Uno de los problemas más comunes en cromatografía de gases, se presenta al momento en que se tiene que determinar muestras cuyas matrices son complejas y no convenientes para el análisis, es decir, matrices conteniendo contaminantes, impurezas y compuestos que en general no son fácilmente volatilizables y que además, por esta misma razón y por su naturaleza, pueden dañar u obstruir sistemas importantes del equipo. Esto también se presenta para muestras cuyo tratamiento, almacenaje y

transporte resulta complicado por propiedades intrínsecas de las mismas, como por ejemplo, el óxido de etileno que tiene un punto de ebullición muy bajo, lo que complica su manipulación durante los procedimientos analíticos. Para solventar estos inconvenientes y muchos otros que se presentan en la introducción de este tipo de muestras está una técnica llamada Headspace, con la que se toma una porción del vapor que está en equilibrio con la fase líquida de la muestra y es esto lo que se inyecta, facilitando el análisis.

2.4.- Introducción de muestra en Cromatografía de Gases por Headspace (HS, espacio confinado)

Las técnicas de headspace tienen sus principios básicamente desde la implementación de la cromatografía de gases, pero su desarrollo y optimización ha ido de la mano con el avance tecnológico en diseños de sistemas automatizados, que es donde se ha establecido como tal, ya que es un proceso muy sensible para el que se necesita mucha precisión. Además, ha resultado sumamente útil para el tratamiento de muestras con analitos volátiles en matrices complejas con componentes no volátiles, ya que se independiza tanto de los problemas que estos pueden causar, como de los diversos tratamientos que sufren dichas muestras para librarlas de estos componentes no deseados, librándose así de los errores y pérdidas que estos procedimientos implican.

[16][17]

2.4.1.- Tipos de headspace

Existen dos maneras de trabajar con headspace y son las siguientes:

La primera consiste en un proceso de dos etapas: inicialmente, la muestra (líquida o sólida) es colocada en un vial teniendo un volumen de gas sobre ella y se cierra y sella el vial con un septum, este espacio que se deja es el que le da el nombre al

procedimiento, es denominado headspace en inglés, espacio de cabeza o espacio confinado en español. Luego el vial es termostatzado a temperatura constante hasta que se alcanza el equilibrio entre las dos fases. Luego de esto una alícuota de la fase gaseosa (el headspace), es introducida en el flujo de gas de arrastre, que lo lleva hasta la columna, donde será analizado de la manera usual.

La cuantificación es posible analizando solo la fracción gaseosa ya que como se establece en la ley de Raoult y la ley de Dalton, existe una proporcionalidad entre la composición de la fase líquida con respecto a la fase gaseosa.

En esta forma las dos fases en el vial de muestra están en **condiciones estáticas** y la transferencia de muestra se lleva a cabo luego de alcanzado el equilibrio. Entonces este tipo de procedimiento es denominado **análisis de HS estático o en equilibrio**.

En este método, la alícuota gaseosa es analizada y la información obtenida de esta alícuota es utilizada para determinar la naturaleza y concentración del o de los analitos presentes en la muestra original.

La segunda manera de trabajar con HS, consiste en no esperar a que se alcance el equilibrio para llevar a cabo la extracción de fase gas, sino en realizar la extracción de manera continua. Removiendo fase gas continuamente, se induce a que los analitos volátiles intenten recobrar un equilibrio que al final no es alcanzado, de esta forma, la totalidad de los analitos volátiles son removidos de la muestra, esto se denomina "extracción de gas continua".

En la forma más frecuente de extracción de gas continua, un gas inerte (el gas de purga) se pasa a través de la muestra líquida y la solución de muestra es extraída por las burbujas de gas. El gas efluente se conduce a través de una trampa conteniendo un adsorbente, que retardará a los analitos llevados hasta allí por el gas de purga. Cuando

la extracción es completa, los analitos colectados pueden ser analizados liberándolos rápidamente desde la trampa (usualmente por calentamiento y por descarga), y conduciendo esta “baba” hacia el cromatógrafo de gases. Este procedimiento es denominado **HS dinámico o método de purga y trampa**.^[16]

De aquí en adelante solo se hará énfasis en el análisis por headspace estático, que es el método de interés para el presente trabajo.

2.4.2.- Bases teóricas de la introducción de muestras por Headspace

En la figura 4 se muestra la distribución de las fases dentro de un vial para el análisis por headspace, las fases son denominadas “S”, la fase condensada, donde se encuentra la muestra y “G”, la fase gaseosa. La distribución de los analitos entre las fases se dará de acuerdo al equilibrio termodinámicamente controlado. El sistema representado por el vial está caracterizado por los siguientes valores:

V_V = volumen total de vial.

V_S = volumen de la fase de muestra.

V_G = volumen de la fase gaseosa, donde $V_V = V_S + V_G$ (1)

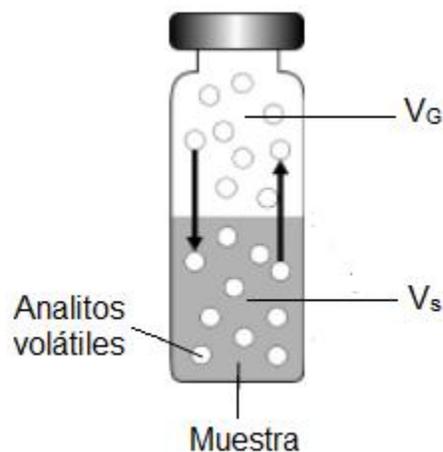


Figura 4.- Vial para Headspace.

Los volúmenes relativos de las dos fases están caracterizados por la **relación volumétrica de fases β** :

$$\beta = V_G/V_S \quad (2)$$

Sustituyendo (1) en (2) y reordenando se tiene que:

$$V_G = V_V \cdot \frac{\beta}{1+\beta} \quad (3)$$

Se asume que el volumen de la fase de muestra después de alcanzado el equilibrio, es igual al volumen de la muestra original, es decir, la cantidad de analito transferido a la fase gas durante el equilibrio no debe representar un cambio apreciable en el volumen de la muestra inicial:

$$V_0 = V_S \quad (4)$$

La cantidad de analito en la muestra original es W_0 , y su concentración original es C_0 :

$$C_0 = \frac{W_0}{V_S} \quad (5)$$

Luego de alcanzar el equilibrio las respectivas cantidades del analito en las dos fases son W_S y W_G y sus concentraciones son C_S y C_G :

$$C_S = \frac{W_S}{V_S} \quad (6)$$

$$C_G = \frac{W_G}{V_G} \quad (7)$$

$$W_S + W_G = W_0 \quad (8)$$

La distribución del analito entre las dos fases en el equilibrio es expresada por la **constante de equilibrio** termodinámicamente controlada. En analogía a la cromatografía de gases se prefiere el término sinónimo a este, el **coeficiente de partición**:

$$= \frac{C_S}{C_G} \quad (9)$$

Sustituyendo (6), (7) y (2) en (9) y reordenando tenemos que:

$$= \frac{W_S}{W_G} * \beta \quad (10)$$

El coeficiente de partición es un parámetro fundamental que expresa la distribución de masas en las dos fases del sistema. La misma depende de la solubilidad del analito en la fase condensada: compuestos con alta solubilidad tendrán una concentración alta en la fase condensada con respecto a la fase gas ($C_S \gg C_G$), por lo que el valor de K podría ser muy alto. En el caso contrario, cuando los analitos son poco solubles en la fase condensada, C_S tendrá un valor cercano a C_G y podría ser incluso menor, por lo que K sería pequeña.

Sustituyendo (5), (6) y (7) en (8) y reordenando para C_G se tiene que:

$$C_G = \frac{C_0}{(K + \beta)} \quad (11)$$

En un sistema determinado y bajo condiciones dadas K y β son constantes, por lo que el término $(K + \beta)$ y sus recíprocos también serán constantes. Entonces podemos decir que:

$$C_G = (\text{ctte}) * C_0 \quad (12)$$

En otras palabras, en un sistema dado, la concentración en el headspace es proporcional a la concentración de la muestra original.

De las reglas básicas de cromatografía de gases, se sabe que el área de un pico obtenido para un analito determinado, es proporcional a la concentración del analito en la muestra analizada. En nuestro caso, en la alícuota de analito que es analizada la concentración es C_G . Entonces para el área de pico obtenida se puede decir que:

$$A = (\text{ctte}) * C_G \quad (13)$$

Donde la constante representa la influencia de un número de parámetros analíticos y el factor de respuesta del detector. Combinando (12) y (13) se obtiene que:

$$A = (\text{ctte}) * C_0 \quad (14)$$

Donde las constantes combinadas incorporan la influencia del headspace, la intrínseca de GC y los parámetros del detector.

Se puede decir entonces si una alícuota del headspace en equilibrio, es analizada por GC, el área de pico obtenido para el analito de interés será directamente proporcional a su concentración en la muestra original. Ésta es la relación fundamental en que se basa el análisis cuantitativo HS-GC. En relación a la constante incorporada en (14), se sabe que su evaluación numérica podría ser bastante difícil, por lo que un requisito esencial para un análisis reproducible es la reproducción exacta de las condiciones analíticas y más aún si la determinación cuantitativa es basada en el análisis comparativo de la muestra y un estándar.

Combinando (11) y (13) se obtiene:

$$A \propto C_G = \frac{C_0}{(\alpha + \beta)} \quad (15)$$

Aquí se representa la relación, en equilibrio, entre el área del pico obtenido a partir del análisis de una alícuota del headspace, la concentración del analito en el headspace, la concentración del analito en la muestra original, el coeficiente de partición y la relación de las fases en el vial.

2.4.3.- Relaciones fisicoquímicas involucradas

En un sistema de headspace determinado, el valor del coeficiente de partición puede ser manipulado modificando las condiciones analíticas. Para racionalizar los factores que influyen en su valor, se emplean tres leyes básicas: la ley de Dalton, ley de Raoult y ley de Henry.

Según la ley de Dalton, la presión total del sistema es igual a la suma de las presiones parciales de los gases presentes en el mismo (en este caso una mezcla):

$$P_{total} = \sum P_i \quad (16)$$

De esta ley también se sabe que la fracción de la presión ejercida por un gas es igual a la fracción de su número total de moles en la mezcla gaseosa, es decir:

$$\frac{P_i}{P_{total}} = \frac{n_i}{n_{total}} = x_{G(i)} \quad (17)$$

$$P_i = P_{total} * x_{G(i)} \quad (18)$$

Donde n representa el número de moles presentes y $x_{G(i)}$ es la fracción molar de un componente particular en la mezcla gaseosa. Si la mezcla es diluida y con una composición determinada, se puede utilizar la concentración del componente en lugar de la fracción molar:

$$x_{G(i)} = (cte) * C_{G(i)} \quad (19)$$

Donde la constante representa la conversión de fracción molar a unidades de concentración. Combinando (18) y (19) se tiene:

$$P_i = C_{G(i)} \quad (20)$$

Lo que quiere decir que la concentración del analito es proporcional a la presión parcial que ejerce en el sistema.

A partir de la ley de Raoult se tiene que la presión de vapor de un soluto disuelto, sobre su solución (es decir, presión parcial), es directamente proporcional a su fracción molar en la solución $x_{S(i)}$ y la constante de proporcionalidad es la presión de vapor del analito puro:

$$P_i = P_i^0 * x_{S(i)} \quad (21)$$

La ley de Raoult es válida solo para mezclas ideales y en la mayoría de los casos existen desviaciones a la ley. Para compensar esto, se introduce un factor denominado **coeficiente de actividad** (γ_i), que es considerado como un factor de corrección para la concentración, que la modifica para la denominada concentración real o activa.

$$P_i = P_i^0 * \gamma_i * x_{S(i)} \quad (22)$$

Este coeficiente depende de la naturaleza de cada componente y refleja la interacción molecular entre el analito y los otros componentes de la muestra, particularmente la matriz. Entonces el efecto matriz es representado por la influencia del coeficiente de actividad. Para altas concentraciones del analito, el coeficiente de actividad también se convierte en una función de la concentración, mientras que en soluciones diluidas es constante e independiente de la concentración del analito. En una solución idealmente diluida, existe una linealidad general entre la presión de vapor parcial y la concentración molar del analito:

$$p_i = H \cdot x_i \quad (23)$$

Donde H es la constante de la ley de Henry. En una solución ideal, donde el coeficiente de actividad es igual a 1, H es igual a la presión de vapor del analito puro. La ley de Henry es la base de la cromatografía de gases y el análisis por headspace.

En soluciones idealmente diluidas, cuya concentración es usualmente menor al 0.1% cada molécula de analito disuelta está rodeada solamente por moléculas de solvente, por lo que solo las fuerzas intermoleculares entre soluto y solvente son efectivas, mientras que la probabilidad de interacción soluto-soluto incrementa con la concentración del analito.

Sustituyendo p_i de (18) en (22) se tiene que:

$$p_i = p_{total} \cdot x_{G(i)} = p_i^0 \cdot \gamma_i \cdot x_{S(i)} \quad (24)$$

Y sustituyendo la fracción molar por la concentración al ser una solución diluida, se tiene:

$$\frac{p_{total}}{p_i^0 \cdot \gamma_i} = \frac{x_{S(i)}}{x_{G(i)}} = \frac{C_{S(i)}}{C_{G(i)}} = K \quad (25)$$

Por lo que:

$$\frac{1}{x_i^0 + \gamma_i} \quad (26)$$

Es decir, que el coeficiente de partición es inversamente proporcional a la presión de vapor y a la actividad del analito: aumentar estos valores disminuirá el coeficiente de partición del analito. Por otra parte, en la ecuación (15), una disminución del coeficiente de partición conlleva un incremento de la concentración del analito en el headspace en equilibrio, lo que aumenta la sensibilidad del headspace.

2.4.4.- Sensibilidad del headspace

Cuando se habla de sensibilidad para el análisis de headspace, se habla de cantidad de analito en la fase gaseosa o en el headspace como tal, que está directamente relacionado con el área de pico que se obtendrá al realizar la medición por GC y esta, a su vez, es directamente proporcional a la concentración del analito. La meta es alcanzar la mayor cantidad de analito en el headspace al alcanzar el equilibrio, ya que a medida que aumente el área de pico con respecto a la concentración de una muestra dada, serán menores las concentraciones de analito en la muestra que se podrían determinar.

A partir de la ecuación (15) sabemos que:

$$A \propto C_G = \frac{C_0}{(1 + \beta)} \quad (15)$$

Lo que indica que la sensibilidad del headspace (el área de pico obtenida) depende del efecto combinado de K y β . Esta, que es una relación complicada, nos indica que podemos modificar la sensibilidad del headspace modificando estos dos términos. Los parámetros operacionales que se modifican para lograr esta meta son la temperatura y

el volumen de muestra en el vial. La manera como afectan la sensibilidad del headspace, así como su relación con K y β , se describe a continuación:

2.4.4.1.- Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad del headspace

La temperatura del proceso está relacionada con la presión de vapor de los compuestos y el coeficiente de partición K . En principio, la relación que existe entre la temperatura y la presión de vapor de un compuesto puro es exponencial y se describe de la siguiente manera:

$$\log P_i^0 = -\frac{B}{T} + C \quad (27)$$

Donde B y C son constantes específicas para cada sustancia y T es la temperatura absoluta.

Esta ecuación indica que incluso la variación más pequeña de temperatura, puede cambiar el valor de la presión de vapor de manera muy significativa. Por ejemplo para el agua, una temperatura de 60°C corresponde a una presión de vapor de 19,9 kPa, pero para una temperatura de 61°C la presión registrada es de 20,8 kPa, es decir que el cambio de temperatura por un grado centígrado, produjo un aumento de 4,5% en la presión de vapor.

De la ecuación (26) se tiene la relación del coeficiente de partición con la presión de vapor:

$$= \frac{(ctte)}{K_i^0} \quad (28)$$

$$\log = \log(ctte) = \log K_i^0$$

Sustituyendo en (27), se obtiene la relación de la temperatura con K:

$$\log = \frac{B'}{T} - C' \quad (29)$$

Donde C' es la suma de la constante C de (27) más la constante de la ecuación (28).

2.4.4.2.- Efecto del volumen confinado de muestra en la sensibilidad del headspace

En este caso el término que se relaciona con el volumen de la muestra es la relación de fases β , que era considerado constante en la evaluación del efecto de la temperatura. Entonces, recordando que:

$$\beta = V_G/V_S \quad (2)$$

El volumen de la muestra en el vial se expresa como la **fracción de fase** (ϕ_S) de la muestra:

$$\phi_S = \frac{V_S}{V_V} \quad (30)$$

Este término es muy similar a la relación de fases pero con la diferencia de que expresa el volumen de muestra como una fracción del volumen total del vial. Ambos factores se relacionan de la siguiente manera:

$$\phi_S = \frac{1}{1 + \hat{f}} \quad (31)$$

$$\beta = \frac{1 - \phi_S}{\phi_S} \quad (32)$$

Aquí se nota rápidamente como afecta la fracción de fase a la relación de fases, por ejemplo, si se llena un vial al 50% de su capacidad, el valor de la fracción de fase es de 0.5 por lo que el valor de la relación de fases sería 1. Este valor, así como su variación guardan cierta relación con el coeficiente de partición como lo indica la ecuación (15), a mayores valores de K es obvio que el valor de β tendría una contribución poco significativa, mientras que esta se hace más importante a medida que disminuye K. Como ejemplo se tiene una solución acuosa de ciclohexano y dioxano, termostatizados a 60°C y empleando volúmenes de 1 y 5 mL de muestra en cada caso. Para el dioxano con una K de 642, el área de pico sólo cambia 1.3% (71,848 vs. 72,800), mientras que para el ciclohexano, con una K de 0,04 se obtiene una variación del 82% en el área de pico (42,882 vs. 237,137). ^{[16][17]}

Partiendo de esta base teórica se realiza un estudio de los trabajos enfocados en la determinación de óxido de etileno en dispositivos médicos que han sido más resaltantes históricamente, así como los de mayor relevancia para esta investigación.

3.- Antecedentes

3.1.- D. E. Marlowe, N. T. Lao y colaboradores, Rockville, USA, año 1987. [18]

En este estudio, 13 laboratorios distintos realizaron una comparación de cuatro diferentes métodos de extracción de óxido de etileno en un polímero acrílico empleado en dispositivos médicos.

Todos los laboratorios participantes en este estudio utilizaron cromatógrafos de gas, equipados con detectores de ionización a la llama y columnas empacadas de vidrio con relleno de 3% Carbowax 20M en Chromosorb 101 80/100 Mesh para extracción acuosa y headspace y Chromosorb 102 80/100 para extracción con acetona y dimetilformamida (DMF).

El material de muestra fue el polímero acrílico XT250-301 de industrias CYRO en forma de gránulos, esterilizado con OE y luego sometido a distintos tiempos de aireación para establecer un aproximado de tiempos de bajo, medio y alto. Para cada método de extracción se empleó aproximadamente 1g de polímero colocado en viales. Para la extracción **acuosa**, se añadió 5 mL de agua a los viales, que fueron sellados con septum de teflón y almacenados de forma invertida a 37°C por 24 horas.

Para la extracción con **acetona y dimetilformamida** se tomaron 10 mL de solvente en cada caso y se añadieron a los viales, que fueron sellados con septum de teflón y colocados en almacén de forma inversa durante 24 horas a temperatura entre 20 y 25°C. Para el método de extracción por headspace o **extracción térmica**, los viales

conteniendo la muestra fueron sellados con septum de teflón y calentados en horno por 2 horas a 100°C. Luego porciones de 100 µL del headspace fueron inyectados para su análisis por GC por duplicado. Luego los viales fueron purgados con nitrógeno por 30 segundos, de nuevo sellados y calentados a 100°C por 2 horas para luego tomar 100 µL e inyectarlos al GC. Este procedimiento se realizó una vez más para un total de 3 incubaciones de 2 horas. El contenido de OE total se determinó sumando la concentración de OE promedio determinada para cada incubación.

Se determinó el contenido de OE en las muestras cuya concentración era desconocida comparando figuras de mérito en cada determinación. En la tabla 10 se reflejan los resultados obtenidos.

Tabla 10.- Resultados de la determinación de OE

Método de extracción	Tiempo de aireación (Aproximado)	Concentración de OE promedio (ppm)	Número de laboratorios	Reproducibilidad (desviación estándar)	Coefficiente de variación estimado
Agua	Medio	72,4	7	12,0	16,6
	Bajo	122,4	7	21,5	17,6
	Alto	38,2	10	6,6	17,3
				Promedio	17,2
Térmica	Medio	238,8	10	44,3	17,3
	Bajo	315,3	10	61,8	19,0
	Alto	163,2	12	44,7	27,6
				Promedio	21,3
Acetona	Medio	273,7	11	50,6	18,5
	Bajo	336,7	11	58,1	17,2
	Alto	181,3	11	23,7	13,1
				Promedio	16,3

Continuación tabla 10

Método de extracción	Tiempo de aireación (Aproximado)	Concentración de OE promedio (ppm)	Número de laboratorios	Reproducibilidad (desviación estándar)	Coefficiente de variación estimado
DMF	Medio	291,5	11	23,8	8,2
	Bajo	353,9	10	28,0	7,9
	Alto	194,1	11	16,8	8,6
				Promedio	8,2

Estos resultados demuestran que el coeficiente de variación total de los métodos empleados va de 8% a 22%, donde la mayor variación se obtuvo en el método de extracción térmica y la menor se obtuvo por extracción con DMF. Esto indica que cada uno de los procedimientos aquí evaluados puede ser útil y válido para la determinación de OE residual en material polimérico a concentraciones en el rango de 100 a 400 ppm.

3.2.- N. T. Lao, H. T. C. Lu y colaboradores, Rockville, USA, 1995. ^[19]

Éste trabajo es muy similar al presentado en 1987 por Merlowe, Lao y colaboradores, con la diferencia de que fue un trabajo de comparación interlaboratorio dirigido a determinaciones de OE, pero en polietileno de alta densidad (HDPE) y polivinil cloruro (PVC), para uso en dispositivos médicos a bajas concentraciones del OE, específicamente un rango entre 2,8 y 42,3 ppm. El trabajo fue llevado a cabo por 15 laboratorios empleando tres distintos métodos de extracción de OE de la muestra: extracción con agua, con acetona y por headspace o térmica. Los materiales de muestra se airearon luego de la esterilización en distintos periodos para alcanzar valores de medida bajos, medios y altos.

Todos los laboratorios emplearon cromatógrafos de gas equipados con detectores de ionización a la llama y columnas empacadas de vidrio con relleno de 3% Carbowax 20M en Chromosorb 101 80/100 Mesh para extracción acuosa y headspace y Chromosorb 102 80/100 para extracción con acetona.

Para cada método de extracción se empleó aproximadamente 1g de PVC y de HDPE respectivamente colocado en viales. Para la extracción **acuosa**, se añadió 1,5 mL de agua a los viales que fueron sellados con septum de teflón y almacenados de forma invertida a 37°C por 24 horas. Para la extracción con **acetona** se tomaron 1,5 mL de solvente para el HDPE y 5 mL para el PVC y se añadieron a los viales, que fueron sellados con septum de teflón y colocados en almacén de forma inversa durante 24 horas a temperatura entre 20 y 25°C. Para el método de **extracción térmica**, los viales conteniendo la muestra fueron sellados con septum de teflón y calentados en horno por 1 hora a 100°C. Luego porciones de 100 µL del headspace fueron inyectados para su análisis por GC por duplicado. Luego los viales fueron purgados con nitrógeno por 30 segundos, de nuevo sellados y calentados a 100°C por 1 hora para luego tomar 100 µL e inyectarlos al GC. Este procedimiento se realizó una vez más para un total de 3 incubaciones de 1 hora. El contenido de OE total se determinó sumando la concentración de OE promedio determinada para cada incubación.

En las tablas 11 y 12 se presenta el sumario de los resultados obtenidos:

Tabla 11.- Estudio comparativo de OE para PVC

Método	Rango de concentración OE (ppm)	CV %	Repetitividad combinada (%)	Reproducibilidad combinada (%)
Agua	2,75-8,32	12,38	155,0	176,0
Acetona	19,47-42,30	8,58	99,7	104,3
Térmica	14,44-23,00	12,42	80,2	138,1

Tabla 12.- Estudio comparativo de OE para HDPE

Método	Rango de concentración OE (ppm)	CV %	Repetitividad combinada (%)	Reproducibilidad combinada (%)
Agua	3,80-20,09	8,73	198,3	198,2
Acetona	8,30-40,45	3,63	197,8	187,1
térmica	10,99-31,97	6,09	156,0	157,3

Éste estudio demuestra que los coeficientes de varianza promedio obtenidos en la comparación interlaboratorio de los 15 institutos participantes para cada método y aplicado en cada material, son prueba de que los tres métodos de extracción utilizados son válidos y útiles para la determinación de OE residual en materiales poliméricos empleados en dispositivos médicos en un rango de concentraciones de 2,8-42,3 ppm.

3.3.- M. Ruíz de Arechavaleta, A. Rosso, I. Fraga, CISCOE Parque tecnológico Miguelete, Argentina, año 2000. ^[20]

Este estudio presenta la validación de un método de determinación de OE residual en dispositivos biomédicos evaluando figuras de mérito como linealidad, límites de cuantificación, repetitividad, error sistemático y recuperación.

Como método de trabajo se tomó la técnica HS-GC, empleando un cromatógrafo con detector de ionización a la llama, utilizando como forma de extracción un solvente, el isopropanol y como método de cuantificación el análisis por estándar interno usando óxido de propileno (OP).

La muestra esterilizada se pesó en un vial y se extrajo el esterilizante con 5 mL de isopropanol, aplicando agitación térmica a temperatura constante. Luego se analizó el headspace de las soluciones por GC y se cuantificó mediante una calibración considerando la relación de áreas entre el OE y el óxido de propileno.

La linealidad se evaluó construyendo una curva de calibración a partir de una solución de OE 0,565 mg/mL, obteniendo los resultados que se presentan en las tablas 13 y 14.

Se concluye que este sistema es lineal entre 0 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de analito en solución, lo que representa un rango de óxido de etileno entre 0 y 200 $\mu\text{g/g}$.

Luego se evaluó la repetitividad como el grado de dispersión entre una serie de resultados, obtenidos a partir de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea y bajo las mismas condiciones, lo que es comúnmente expresado como la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Esto se hizo analizando un agregado, por sextuplicado, de 10 μL de la solución de OE de concentración 0,565 mg/mL a 5 mL de isopropanol, como se muestra en la tabla 15.

Tabla 13.- Curva de calibración OE

Volumen de solución OE (µL)	Masa de OE (µg)	Área OE	Área OP	Relación de áreas (OE/OP)
0	0	190	56882	0,003340248
1	0,565	630	54659	0,011526007
1	0,565	642	57324	0,011199498
5	2,826	2582	55968	0,046133505
5	2,826	2775	57596	0,048180429
10	5,653	5244	58571	0,092697672
10	5,653	5451	58459	0,093101505
50	28,26	27547	56570	0,486954216
50	28,26	28003	59170	0,473263478
100	58,53	54417	56197	0,968325711
100	58,53	55457	58400	0,949606164
200	113,05	106669	55021	1,938696134
200	113,05	110413	58163	1,898337431

Tabla 14.- Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0,999904888
Coefficiente de determinación R ²	0,999809385
R ² ajustado	0,999792057
Error típico	0,010104842
Observaciones	13

El rango obtenido entre los valores de los replicados fue de (5,4825-5,2796) µg/0,5g = 0,4058 µg/g.

Para la evaluación del error sistemático se evaluó la coincidencia entre los valores hallados y el valor teórico agregado, obteniendo los resultados que se aprecian en la tabla 16.

Tabla 15.- Evaluación de la repetitividad

Masa de OE agregado (μg)	Área OE	Área OP	Relación de áreas (OE/OP)	Masa de OE calculado (μg)
5,653	5049	56350	0,089600710	5,2796
5,653	5249	57894	0,090665699	5,3424
5,653	5104	54856	0,093043605	5,4825
5,653	5356	59771	0,089608673	5,2801
5,653	5156	56239	0,091680151	5,4021
5,653	5224	58214	0,089737864	5,2877
Promedio				5,35
Desviación estándar				0,08
CV(%)				1,5

Tabla 16.- Evaluación del error sistemático

Nivel	Valor teórico agregado (g)	Promedio de mediciones (g)	Desviación estándar	t_{hallado}
1	0,565	0,707792153	0,024554298	14,2
3	5,653	5,345724907	0,082407096	9,1

Se concluye mediante un estudio con test de hipótesis ($t = 2,57$; $n-1 = 5$ y nivel de confianza 95%), que la diferencia entre el promedio de las mediciones y el valor teórico agregado es significativa y por lo tanto contribuye a la incertidumbre global del método.

Para el estudio de la recuperación (permite decir si el método es capaz de determinar la totalidad del analito en la muestra), se analizó una muestra de tubuladura (sección de tubería) esterilizada con OE en dos sets y por cuadruplicado, donde a uno de ellos se le hizo un agregado de 5 μ L de una solución de OE concentración 0,565 mg/ml, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 17.- Cálculos obtenidos del análisis de la recuperación

Promedio (%)	101
Desviación estándar	5
CV (%)	5,69

Se concluye que la recuperación para niveles de OE de 15 μ g es satisfactoria.

En base a todos los estudios realizados se concluye que la metodología utilizada para el análisis del OE es adecuada en concentraciones entre 0 y 200 ppm.

3.4.- A. D. Lucas, K. Merrit, V. M. Hitchins y colaboradores, USA, año 2003. ^[21]

Aquí se presenta un estudio bastante amplio sobre los residuales de OE en materiales empleados para su uso como dispositivos médicos, empleando como método de análisis HS-GC y siguiendo los métodos de muestreo, tratamiento de muestras, extracción y análisis establecidos en las normas ISO correspondientes al tema.

Se realizó comparación entre los niveles de EO residuales en dos poliuretanos (PU 75D y PU 75A), en nylon y en catéteres sólidos y huecos. Se evaluó la necesidad de extracciones adicionales a la inicial para cada material, la influencia en el solvente empleado para la extracción y se hizo una comparación entre los niveles de OE total extraídos y los niveles de OE biodisponibles (extracción acuosa).

Se empleó un cromatógrafo con detector de FID para el análisis y para la extracción se tomaron tiras de la muestra sólida y se sellaron en viales para ser extraídos térmicamente por headspace calentando a 100°C por 1 hora, seguido del análisis del headspace por GC. Las muestras fueron repetidamente calentadas y analizadas con purgas de nitrógeno entre ciclos hasta alcanzar el límite de cuantificación del OE.

Para evaluar biodisponibilidad de residuos de OE se compararon agua, media (RPMI-1640 con L-glutamina y suero bovino fetal al 10%), y aceite de semilla de algodón como solventes de extracción, resultando como mejor el agua, por lo que el resto de muestras se trató extrayendo con 13 mL de este solvente por 24 horas a 37°C.

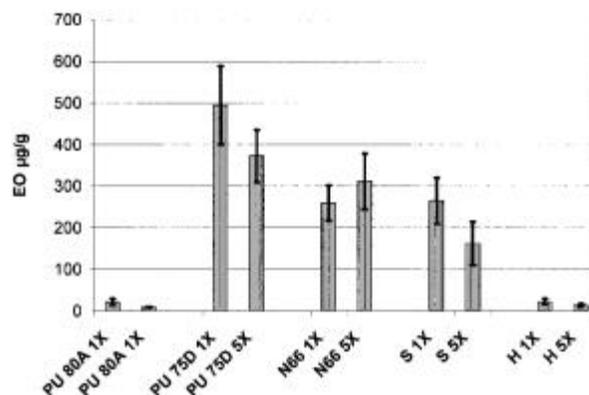


Gráfico 1.- Efecto de reesterilización

En la gráfica 1, se observan los resultados obtenidos en el análisis de OE para los distintos materiales a diferentes cantidades de ciclos de esterilización. Donde N es nylon, S son los catéteres sólidos y H los catéteres huecos.

Aquí se observó que el efecto de realizar 1 o 5 esterilizaciones en la muestra no tiene influencia significativa en la cantidad de OE residual para las muestras estudiadas.

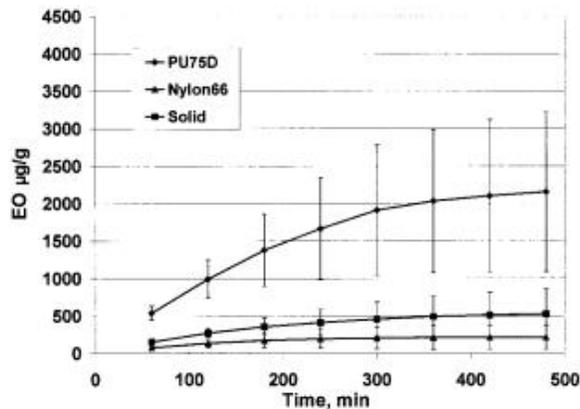


Gráfico 2.- Extracción térmica del OE (por headspace)

En el gráfico 2 se muestra la cantidad de tiempo acumulado empleado en los distintos ciclos de extracción térmica para los distintos materiales, observando como el PU75D tuvo una cantidad de OE mayor a los demás y necesitó de más ciclos para alcanzar un valor constante y como el PU80A y el catéter hueco tuvieron tan poca cantidad de OE inicialmente que no pudo ser graficada.

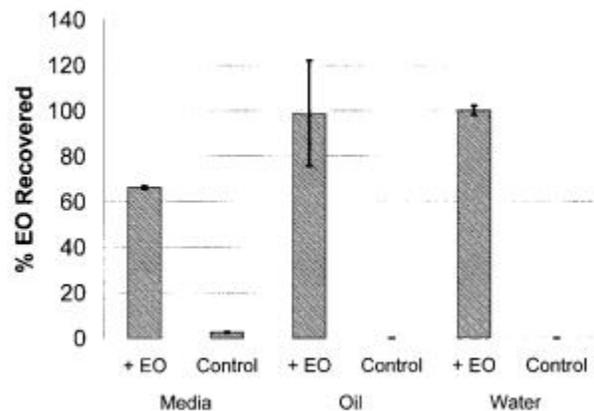


Gráfico 3.- Solventes de extracción

El gráfico 3 demuestra que el agua resultó ser el mejor solvente de extracción para este estudio, ya que en el caso de la media se obtuvo una cantidad de OE muy pequeña y que en el caso del aceite de algodón se obtuvo una reproducibilidad muy pobre.

El gráfico 4 ilustra la diferencia en los niveles de OE obtenidos para el proceso de extracción total en comparación con la extracción acuosa que otorga la cantidad de OE biodisponible.

En éste gráfico es de notar que la diferencia entre la cantidad de OE total y la biodisponible no es mucha para materiales como el PU80A, catéter hueco y nylon mientras que para PU57D y catéter sólido la diferencia es dramática, esto puede ser por la microestructura del material polimérico ya que materiales con cristalinidad aumentada retienen más al OE, mientras materiales más suaves y flexibles lo retienen menos; y la diferencia entre catéteres puede presentarse por la mayor área superficial que tienen los catéteres huecos y por donde el OE puede difundir.

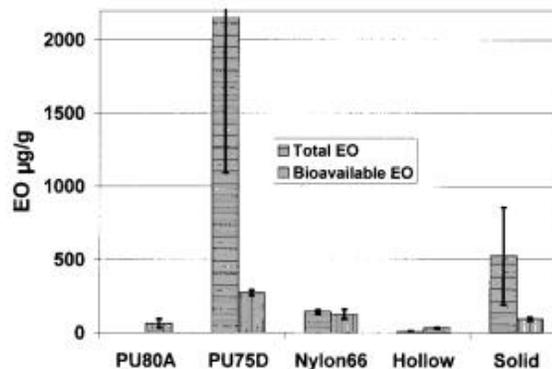


Gráfico 4.- Cantidad de OE total vs cantidad de OE biodisponible

Como conclusión se tiene que los niveles de OE y su biodisponibilidad dependen altamente del tipo de material a utilizar.

3.5.- Informe técnico, unidad de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España, año 2007. [22]

Éste trabajo aplica las metodologías establecidas en las normas ISO para el muestreo, almacenaje, tratamiento, extracción y cuantificación por HS-GC para la determinación de óxido de etileno residual en un tipo de tejido inteligente empleado para fabricar sábanas y colchas utilizadas quirúrgicamente, así como la ropa, gorros y demás implementos barrera empleados quirúrgicamente por médicos, enfermeros y pacientes. El tejido analizado específico es marca ELSANEK.

Los patrones de OE se prepararon a partir una solución concentrada de óxido de etileno en metanol (FUCKA), un primer patrón concentrado en agua (541,36 mg/l). A

partir de éste, se prepararon por dilución acuosa patrones de trabajo para inyección de 5, 0,5 y 0,25 mg/l.

La toma de muestra se realizó de forma que fueran representativas del producto a probar. Se cortaron trozos de ELSANEK de aproximadamente 1.5g de peso a partir de los cuales se desarrollaron todos los experimentos. Se utilizaron para el estudio dos gramajes diferentes (g1 y g2 en lo sucesivo) en función de su espesor.

Para iniciar la extracción, el conjunto de tejidos se dividió en dos grupos con representación de todas las combinaciones en ambos casos, utilizándose volúmenes diferentes de fluido extractor (agua destilada estéril) en cada uno de ellos (volúmenes suficientes para hacer máxima la eficacia de extracción).

Así, se trabajó en tubos de 20 mL de cristal de cerrado hermético con volúmenes de 7.5 mL para un grupo y 15 ml para el otro (la relación de masa de muestra/volumen extractor se encontró en ambos casos dentro del intervalo típico recomendado que oscila entre 1 g en 2 mL hasta 1g en 10 mL y cuyo punto intermedio, 1g en 5 mL tomamos como referencia), para cubrir las piezas de tejido de 1.5g cada una.

A continuación, se llevó a cabo la extracción con simulación de utilización, que es método de referencia, ajustándose la temperatura y los tiempos a la naturaleza de la exposición que sufrirá el paciente, y la duración del contacto del producto con éste. En este caso, la extracción se realizó durante 24 horas en un baño de agitación a 37°C. Seguidamente se recuperaron a partir de cada uno de los tubos, 1,5 ml de solución mediante una jeringa estéril y se inyectaron en viales recubiertos de

politetrafluoroetileno (PTFE) y dotados de septum. Se dejó siempre un espacio muerto en la parte superior del vial no inferior al 10% del volumen total. Se evaluó paralelamente una muestra testigo control no esterilizada para tener en cuenta la presencia de posibles interferencias debidas a otros componentes o residuos con tiempos de retención similares al óxido de etileno. En la tabla 18 se tienen los valores de la medición realizada y el gráfico 5 ilustra la regresión obtenida a partir de éstos.

Tabla 18.- Medición de áreas para blancos y patrones.

Muestra inyectada	Área
Agua	0
Agua y metanol	0
Patrón 0,25 ppm	33
Patrón 0,5 ppm	123
Patrón 5 ppm	438

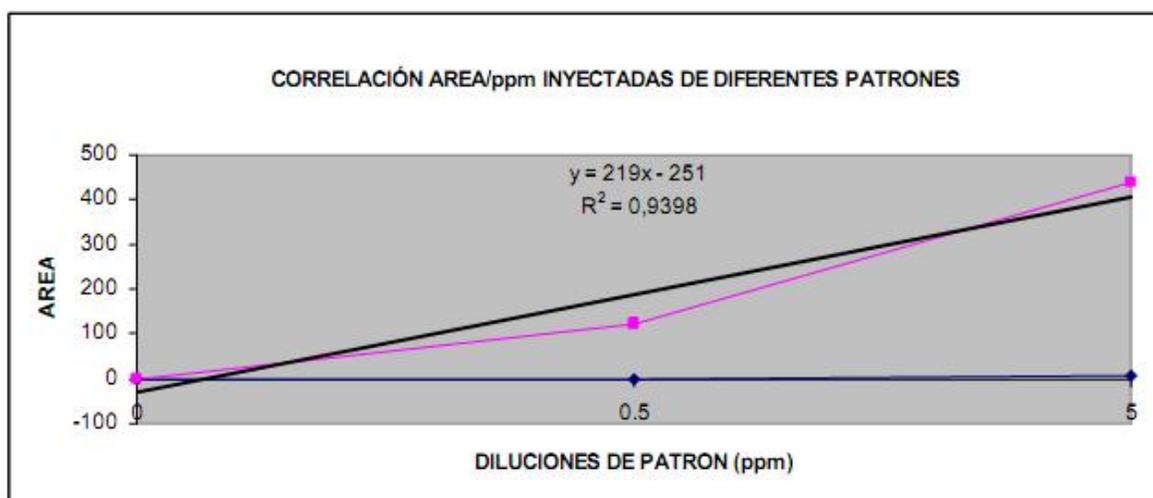


Gráfico 5.- Curva de calibración

Luego se inyectaron todas las muestras extraídas, determinándose el área bajo los picos para cada una de ellas. Los diferentes tipos de muestras incluyeron todas las combinaciones posibles entre los dos gramajes de tejido, las dos diluciones realizadas en cada caso y por último la variable de tiempo entre esterilización/extracción (3 o 13 días). Se incluyó un control de tejido sin esterilizar. La tabla 19 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 19.- Medición de muestras

Muestra	Área	Concentración de OE (ppm)
G1 1/5 13 d	16	1,22
G1 1/5 3 d	39	1,32
G1 1/10 13 d	20	1,24
G1 1/10 3 d	22	1,25
G2 1/5 13 d	18	1,23
G2 1/5 3 d	72	1,47
G2 1/10 13 d	19	1,23
G2 1/10 3 d	70	1,47
G2 1/10 Control sin esterilizar	17	1,22

Finalmente, habiendo realizado todo el estudio siguiendo el criterio de simulación de las condiciones reales de utilización, se concluye, teniendo en cuenta que el límite permisible según las normas vigentes se encuentra en 2 ppm para el óxido de etileno en este tipo de materiales, que ELSANEK tanto tras tiempos de aireación de 3 días como de 13 retiene cantidades de óxido de etileno menores a los límites permitidos, lo que hace que este sea un buen método de esterilización para este tipo de material.

3.6.- Estándar internacional de métodos aprobados para la cuantificación de óxido de etileno en dispositivos médicos, Norma ISO-10993-7, año 2008. [23]

En este estándar se reúne un conjunto de métodos para la cuantificación de óxido de etileno (OE) en dispositivos médicos empleando HS-GC. Contiene especificaciones de muestreo, manejo y transporte de muestras, preparación de estándar, tratamientos de muestra, método de cuantificación y recomendaciones generales incluyendo guías de procedimiento en cada caso.

Propone dos métodos de extracción básicos para la determinación de OE en dispositivos médicos esterilizados:

- Extracción de uso simulado:

Con este método se pretende emular las condiciones de uso del producto realizando la extracción del OE con agua como solvente y realizando su análisis posterior mediante HS-GC.

Para esto se deben realizar extracciones en tiempos equivalentes o excedentes al tiempo máximo para un solo uso del producto y a temperaturas que representen el mayor reto en la simulación. Alternativamente se prepara una serie de extractos que representen varios períodos de tiempo y uso para calcular efectos a exposición diaria o mayor.

- Extracción exhaustiva:

Éste método agrupa a su vez distintos tipos de extracción exhaustiva que están aprobados como métodos alternativos para la cuantificación de OE en productos médicos esterilizados. Como su nombre lo indica en este caso, el objetivo de la

extracción es retirar la totalidad de la cantidad de OE contenida en la muestra para su posterior análisis. Los tipos de extracción exhaustiva son los siguientes:

- Extracción térmica:

Se debe pesar 1g de muestra y colocarlo en un vial con septum, para posteriormente calentarlo a temperatura constante hasta que se alcance el equilibrio en la presión parcial de OE para el headspace. Luego cantidades de 100µg son tomadas con jeringas para gas para su análisis por GC. El proceso de extracción se repite retirando el septum del vial y purgando con corriente de nitrógeno seco para sellar de nuevo el vial y termostatarlo y se repite hasta que no se aprecie un aumento analíticamente significativo en los niveles de residuo detectados.

- Extracción con etanol:

Aquí se deben preparar diferentes patrones de OE en etanol con óxido de propileno como estándar interno y realizar una curva de calibración midiendo estos patrones por HS-GC.

Para el tratamiento de muestras se toman de 0,5 a 5 g de producto y se corta en pequeños pedazos para colocarlos en un vial para headspace y se agregan soluciones patrón de etanol con óxido de propileno, se sella el septum, se calienta a temperatura constante y con agitación suave, luego de lo cual, se toman cantidades de 100µL del headspace para su análisis por GC.

- Extracción con solventes:

En éste método se pueden emplear distintos solventes para la extracción, mientras los más recomendados son los que permitan total disolución del material de muestra, también es permisible emplear solventes no destructores de la muestra como acetona y dimetilformaamida (DMF). En este caso se debe tomar entre 1 y 5 g de producto y colocarlo en un vial para headspace, se transfieren 10mL del solvente empleado al vial y se deja por 24 horas a temperatura ambiente. También es válido emplear temperaturas diferentes que permitan el alcance del equilibrio para headspace.

Datos analíticos de muestras tratadas por extracción con solventes y posterior análisis por HS-GC arrojan que el coeficiente de variación de este tipo de método está entre 1,8 y 4,7 %.

3.7.- M. E. Segui, servicio de esterilización, Hospital Central Mendoza, Argentina, 2009. ^[24]

En este trabajo se realizaron estudios sobre la cinética de desorción de OE residual en materiales empleados para la producción de dispositivos médicos, esterilizados y sometidos distintos tiempos de aireación. Esta determinación se realizó estimando la concentración OE en función del tiempo de aireación al que fueron sometidos.

Para esto se emplearon distintas muestras de PVC. Estas muestras fueron sometidas a un proceso de esterilización típico y luego colocadas en una almacén para su aireación a temperatura ambiente, realizando la toma de muestra en distintos tiempos, 0 horas, 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días respectivamente. Luego de esto se analizaron

dichas muestras empleando la metodología de HS que se describe en la norma ISO 10993-7.

Los resultados obtenidos se ilustran en la tabla 20.

Tabla 20.- Resultados OE residual

Días de aireación	Óxido de etileno ($\mu\text{g/g}$)
0	300
1	45
2	93
7	1,4
14	<1

Luego se graficó estos resultados para obtener la distribución que describe el comportamiento obtenido, como se observa en el gráfico 6.

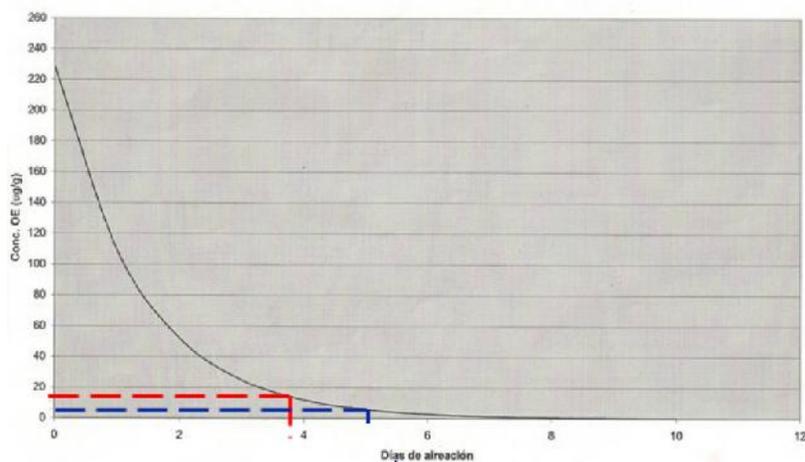


Gráfico 6.- Curva de desorción OE

Con los resultados obtenidos se define una regresión de tipo exponencial y que responde a la siguiente fórmula:

$$C_{OE} = C_0 * e^{-k \cdot t}$$

Donde C_0 es la concentración inicial de OE, k es la constante de desorción y t es el tiempo de aireación, con valores de C_0 de 228,75 $\mu\text{g/g}$ y k de 0,7383 días^{-1} para esta determinación.

Por lo que se concluye que la desorción de OE sigue una cinética de primer orden con un comportamiento exponencial.

4.- Justificación:

Considerando lo planteado en el desarrollo de las referencias bibliográficas, en lo relacionado a la importancia del control en la concentración de óxido de etileno residual en dispositivos médicos, se justifica el desarrollo de métodos sencillos, prácticos y económicos para su determinación.

5.- Objetivos

5.1.- Objetivo General

Desarrollar un método de HS-GC para la determinación de óxido de etileno residual en dispositivos médicos.

5.2.- Objetivos específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas iniciales.
- Ensayar el uso de estándar interno para la cuantificación del óxido de etileno por HS-GC (preparación de patrones y curva de calibración).
- Ajustar las condiciones cromatográficas a los requerimientos establecidos en la teoría para trabajar con HS.
- Evaluar y optimizar los parámetros para la metodología de headspace.
- Realizar la extracción del óxido de etileno del material de muestra, empleando un solvente y de acuerdo a lo establecido en la literatura.
- Cuantificar la cantidad de óxido de etileno residual en material quirúrgico.

6.- Metodología experimental

6.1.- Materiales y equipos

6.1.1.- Cromatógrafo de gases

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases marca Thermo Finnigan, modelo Trace™ GC, equipado con un inyector split-splitless y un detector de Ionización a la Llama (FID, Flame Ionization Detector). Para la adquisición y procesamiento de datos, este equipo cuenta con el software ChromCard. En la figura 5 se observa una fotografía del equipo.



Figura 5.- Cromatógrafo de gases (GC-FID)

6.1.2.- Baño termostático

Se empleó un termostato Marca Julabo, modelo VC-5 ($\pm 0,5$ °C). En la figura 6 se observa el termostato utilizado.



Figura 6.- Baño termostático

6.1.3.- Viales

Se emplearon viales de vidrio transparentes, de 20 mL de capacidad, con tapas de aluminio y septum de silicón, marca Agilent. En las figuras 7, 8 y 9 se pueden observar.



Figura 7.- Viales de vidrio



Figura 8.- Tapas de aluminio para headspace



Figura 9.- Septum de silicón para viales de headspace

6.1.4.- Reactivos utilizados

Óxido de etileno, estándar, 90 %, Biolene.

Óxido de etileno, estándar, 1000 µg/mL en tolueno, Chemical Works.

Metilisobutil cetona, 99 %, Merck.

Acetona, 99,8 %, Merck

Tolueno, 99,5 %, Fischer Scientific.

N,N-Dimetilformamida, 99,9 %, Merck.

Tetrahidrofurano, 99,9 %, Fischer Scientific.

6.1.5.- Material de laboratorio

Inyectadora para líquidos marca Hamilton, de 10 y 100 μ L.

Inyectadora para gases PSC Baton Rogue, de 1 mL.

Inyectadoras plásticas para insulina, de 1 mL

Limpiador de jeringas con calor y vacío marca Hamilton.

Micropipeta de volumen variable, marca Eppendorf, con capacidad de 1000 μ L a 5000 μ L respectivamente. Puntas desechables.

Balanza analítica con una resolución digital de 0,1 mg.

6.1.6.- Muestras

Catéteres uretrales Nelaton #10, elaborados por la empresa nacional Prantomédica®, hechos de cloruro de polivinil (PVC), esterilizados con óxido de etileno, lote 201511.

6.2.- Condiciones cromatográficas preliminares

Este ensayo consistió en evaluar de manera preliminar, si con los equipos e insumos disponibles en nuestro laboratorio era posible una adecuada retención del analito de interés (OE) y su respectiva separación con respecto a un estándar interno. La función del estándar interno estuvo orientada a corregir las posibles faltas de reproducibilidad en las áreas cromatográficas, atribuidas fundamentalmente tanto al sistema de HS, como a la introducción de muestra por inyección manual en el cromatógrafo de gases disponible.

Para los ensayos preliminares se partió de un patrón grado técnico, a manera de no comprometer la disponibilidad de los patrones puros en el momento de optimizar las diferentes condiciones para el análisis. Se utilizó una ampolla de óxido de etileno, empleada para la esterilización de quirófanos y dispositivos afines marca Biolene al 90 %, donde no se indica el disolvente del mismo. Para su disolución y evitar pérdidas por evaporación fue necesario colocar la ampolla cerrada en un recipiente de vidrio refrigerado conteniendo dimetilformamida (DMF) como disolvente. Se rompió la ampolla con la ayuda de un agitador metálico e inmediatamente se cerró el recipiente de manera hermética y con este patrón en disolución líquida, se realizaron los primeros ensayos preliminares.

De partida se empleó una columna capilar de carácter polar, Supelcowax 10. Las condiciones cromatográficas iniciales fueron adaptadas de la literatura: temperatura del inyector 200 °C, temperatura del detector 250 °C, relación de Split de 10, N₂ como fase móvil con un flujo de 1,5 mL/min, flujo de make-up a 30 mL/min (N₂), y temperatura de horno de la columna 60 °C en el modo isotérmico.

Una inyección bajo las condiciones anteriormente descritas se observa en la figura 10, en el cual se obtienen dos bandas bien separadas, la primera muy fina a un tiempo de retención (t_R), de 1,68 min correspondiente al OE y otra posterior, sumamente ancha que llega a saturar el detector, correspondiente al disolvente, para un tiempo total de corrida cromatográfica de 7 min.

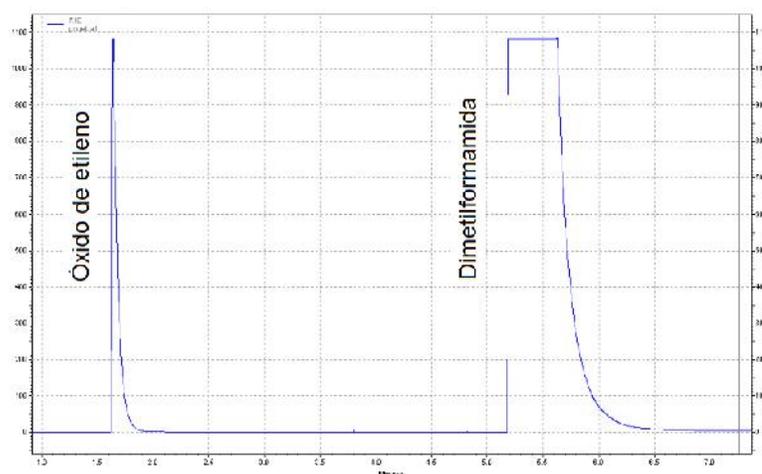


Figura 10.- Cromatograma del primer patrón de OE en DMF

Un t_R de 1,68 min para el analito de interés indica escasa retención, situación poco conveniente ya que pudiera coeluir con alguna impureza presente en las futuras muestras. Debido a esto se modificaron las condiciones cromatográficas a manera de aumentar la retención del OE. Para ello, se evaluó la programación de temperatura de la columna, probando distintas configuraciones hasta obtener un tiempo de retención para el OE de 2,69 min y un tiempo total de corrida de 11 min. Las condiciones cromatográficas preliminares se muestran en la tabla 21.

Tabla 21.- Condiciones cromatográficas preliminares

Columna	Capilar ; J&W Scientific
Fase Estacionaria	Supelcowax 10
Dimensiones	30 m x 0,25 mm (ID)
Temperatura de la columna 1	60 °C
Temperatura de la columna 2	170 °C
Rata de Temperatura	32 °C/min
Tiempo 1	4 min
Tiempo 2	4 min
Fase móvil	Nitrógeno
Flujo	1 mL/min
Inyector	Modo Split
split ratio	15
Temperatura del inyector	200 °C
Temperatura del detector	250 °C
Flujo H ₂	35 mL/min
Flujo Aire	350 mL/min
Flujo N ₂ (make-up)	30 mL/min

Establecidas las condiciones cromatográficas preliminares se procedió a buscar un estándar interno que además de presentar una separación apropiada para el análisis, tuviera propiedades físico-químicas similares al OE. Debido a que en el laboratorio no se contaba con óxido de propileno, compuesto sugerido comúnmente en literatura revisada como estándar interno, se optó por realizar pruebas con otros compuestos en función de la disponibilidad de los mismos. Entre ellos: acetona, metilisobutil cetona (MIBK, methyl isobutyl ketone en inglés) y tetrahidrofurano (THF, tetrahydrofuran en inglés).

Luego de diferentes ensayos con los compuestos antes mencionados se observó una separación relativamente pobre entre los candidatos a estándar interno y el OE. Incluso modificando las condiciones cromatográficas preliminares, no fue posible obtener un cambio favorable en la separación de las bandas. En la figura 11 se observa un cromatograma típico del comportamiento observado para uno de los tres compuestos (acetona).

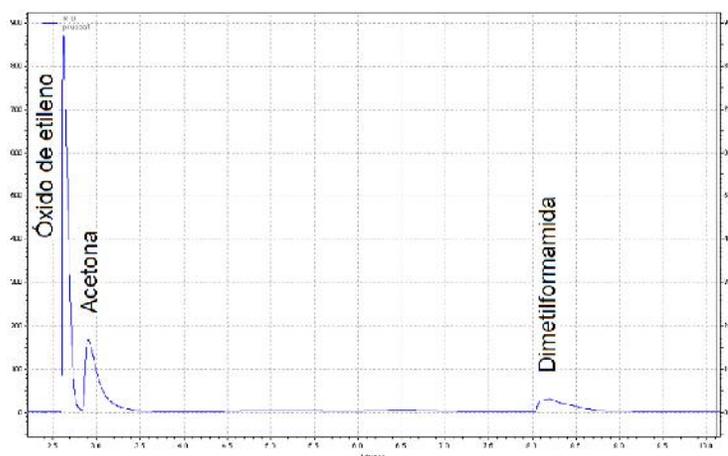


Figura 11.- Prueba para estándar interno (acetona)

Debido a esto, se procedió a cambiar la fase estacionaria por una de menor polaridad, para ello se empleó una columna DB-5MS de 60 m de longitud. Seguidamente se realizaron una vez más las pruebas con los distintos candidatos a estándar interno.

Con esta nueva columna y empleando las condiciones cromatográficas preliminares, se decidió descartar la acetona y el MIBK, ya que el primero no logró separarse de manera efectiva del OE, mientras que el segundo, a pesar de presentar una separación

apropiada, manifestó una impureza muy cercana al analito de interés. Resultando como estándar interno el THF.

Finalmente se realizó una ligera modificación cromatográfica a manera de mejorar la retención, la cual consistió en colocar la temperatura del horno isotérmica a 50 °C. En la figura 12 se observa un cromatograma obtenido para el OE y el estándar interno

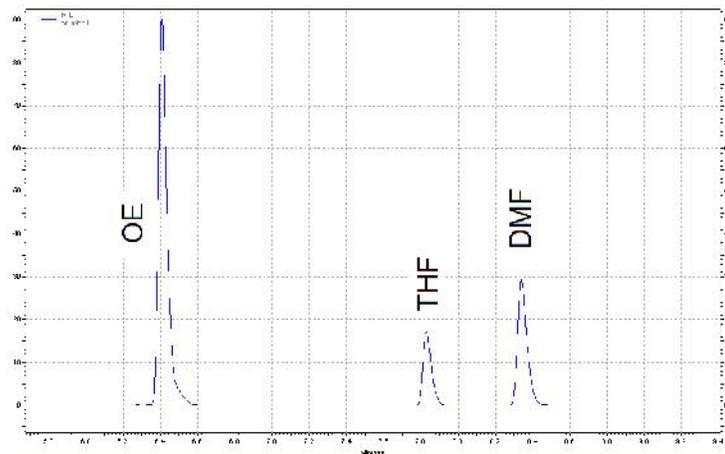


Figura 12.- Prueba para estándar interno (THF)

El t_R obtenido para el OE fue de 6,37 min y para el THF de 7,85 min, el tiempo total de la corrida cromatográfica tomó 8,50 min, observándose una buena separación de las diferentes bandas cromatográficas.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas preliminares para el análisis de OE y escogido el estándar interno en patrones líquidos, se procedió a verificar la factibilidad del análisis en fase vapor, es decir, por HS.

6.3.- Factibilidad de la determinación por HS

Para esta prueba se preparó un patrón combinado de OE y THF en DMF, el cual fue contaminando con una ligera cantidad de tolueno. Esto último fue realizado para comprobar que no se presentara algún tipo de interferencia con el resto de los analitos en estudio, ya que el patrón de OE a utilizar en un futuro es de alta pureza y viene disuelto en tolueno. La prueba fue realizada en un vial para HS de 20 mL y las condiciones se tomaron de manera arbitraria, ya que lo importante era tener una visión inicial del comportamiento del HS.

Debido a la alta volatilidad de los analitos en estudio, los viales se dejaron equilibrar por un tiempo prudencial a temperatura ambiente (25 °C aprox.). Seguidamente se tomó una porción del HS de 1 mL con una jeringa de vidrio para gases y se inyectó, obteniendo el cromatograma mostrado en la figura 13.

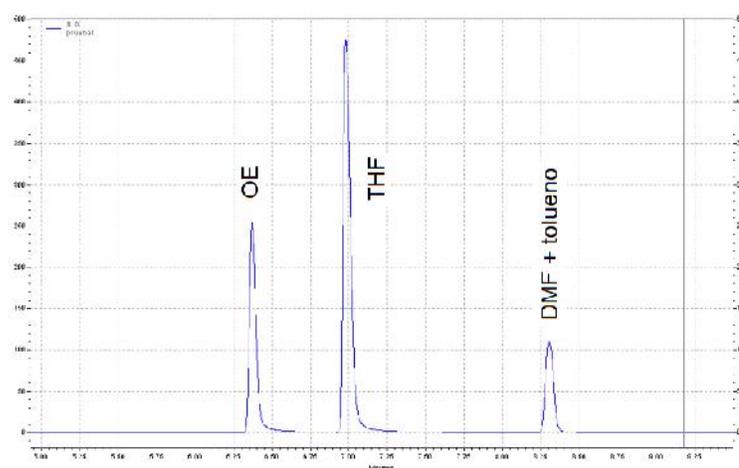


Imagen 13.- Inyección del HS con THF como estándar interno

Se observó que las bandas cromatográficas obtenidas en fase de vapor, corresponden a los mismos t_R de la fase líquida, mostrando la factibilidad de la determinación de OE mediante el análisis por HS. Adicionalmente se puede observar que la banda correspondiente al Tolueno presenta un t_R idéntico al del DMF (comprobado en inyecciones individuales de los compuestos), hecho que indica que el tolueno no representa ningún tipo de interferencia para los análisis interés.

Seguidamente se procedió a preparar un patrón de OE con una concentración conocida, en este caso de 1 $\mu\text{g/g}$, valor ligeramente por debajo del valor máximo permitido para los productos a estudiar, es decir, se deseaba comprobar si se disponía de la sensibilidad necesaria por HS, para la determinación de OE en los productos a analizar.

6.3.1.- Preparación de los patrones de OE y Estándar Interno.

Se procedió a preparar un patrón madre de OE, a partir de una ampolla de 5 mL y de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de OE en tolueno, marca Chem Service. La ampolla se rompió e inmediatamente se transfirió todo su contenido a un vial de vidrio previamente pesado y conteniendo DMF ($\pm 0,1$ mg), Una vez hecho esto, se llevó a peso final con mas DMF ($\pm 0,1$ mg), de manera tal que el patrón madre resultante tuvo una concentración de 277,57 $\mu\text{g/g}$. Se selló el vial con septum de silicón y se cerró herméticamente con una tapa de aluminio, para finalmente dejarlo estabilizar durante 24 horas a 26 °C, como indica la norma ISO-10993-7.

Con respecto a las muestras que serían analizadas, las normas internacionales exigen que a la hora de comercializar los productos esterilizados, la concentración de OE residual debe estar en un valor máximo de 10 $\mu\text{g/g}$ en la muestra. Una concentración de 10 $\mu\text{g/g}$ de OE en muestra, equivale a 3 $\mu\text{g/g}$ de OE en disolución cuando se emplea un vial de 20 mL, se añade 3 g de muestra y se lleva a un peso final de 12 g a 13 g con el disolvente (condiciones teóricamente calculadas en función de las cantidades que podemos trabajar en nuestro laboratorio para los análisis por HS). Sin embargo, se decidió preparar un patrón de 1 $\mu\text{g/g}$, para que quedara ligeramente por debajo del máximo permitido.

Con respecto al estándar interno se preparó una disolución madre de THF de 5000 $\mu\text{g/g}$ de concentración, de la cual se tomó una alícuota, a manera de que la concentración de THF en el patrón combinado fuera de 250 $\mu\text{g/g}$. Concentración alta con respecto a la de OE, ya que debido a la superior volatilidad del mismo con respecto al THF, se presume una menor proporción en el HS (mayor coeficiente de partición y por lo tanto menor sensibilidad).

A fin de comprobar la sensibilidad en el HS, se procedió a inyectar el patrón combinado con las concentraciones anteriormente descritas y se obtuvo el cromatograma mostrado en la figura 14.

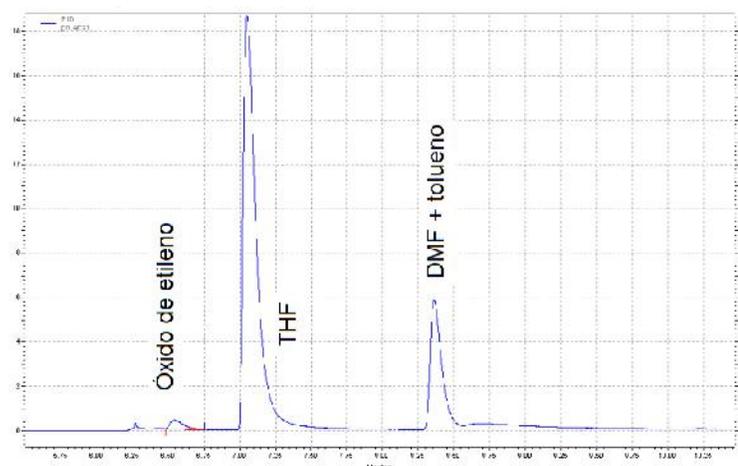


Figura 14.- Cromatograma de patrón de prueba para condiciones de HS

Se pudo observar que el área de la banda de THF es muy superior con respecto a la de OE, por lo que se replanteó una nueva relación de concentración, a manera de obtener una proporción de áreas más adecuada. En base a los cálculos teóricos desarrollados, se decidió preparar un patrón combinado de 1,00 $\mu\text{g/g}$ de OE y 80,00 $\mu\text{g/g}$ de THF.

Con respecto a la banda cromatográfica obtenida para el OE, se observó que la misma tenía una forma irregular, incluyendo la aparición de una interferencia o pico fantasma que no se había observado hasta ese momento. Estos resultados se pueden apreciar en la figura 15, que corresponde a la ampliación del cromatograma anterior en la zona de retención del OE.

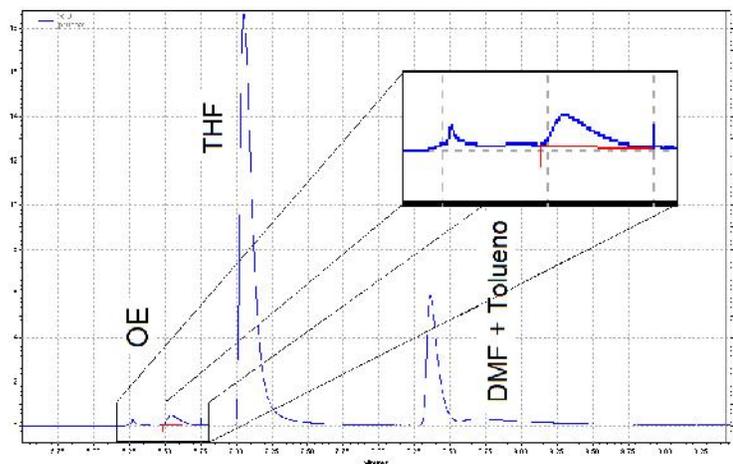


Figura 15.- Cromatograma ampliación de zona de retención del OE

Luego de una serie de estudios, se notó que la aparición de una nueva banda no es atribuida a componentes contaminantes, sino al desdoblamiento de la señal del OE, ya que la literatura reporta esta situación por condensación de OE en el vial de HS y la jeringa con que se inyecta. Por lo tanto, se optó por plantear condiciones de partida para HS que tomaran en cuenta una mayor temperatura para el equilibrio y presurización de los viales. Estas medidas fueron desarrolladas en base a estudios descritos en la literatura, donde se menciona que al utilizar HS automatizado con inyección a presión balanceada deben cumplirse tres etapas muy importantes: el equilibrio, la presurización y la transferencia de muestra. Durante el equilibrio, la muestra es preparada, sellada y calentada, de manera que los analitos se distribuyen entre las fases hasta que su concentración alcanza valores constantes. La presurización se lleva a cabo utilizando gas inerte y a través de una aguja hueca de transferencia con válvulas, utilizada para inyectar luego la muestra al sistema cromatográfico. Aquí, se lleva el vial a una presión superior a la presión natural del mismo y luego, en la etapa de transferencia de la muestra, se cierra la válvula de entrada de gas y se abre la válvula de transferencia a la columna, de manera que la

presión dentro del vial desplace los analitos hacia la misma. La presurización también se emplea para solventar los problemas en la forma de las bandas cromatográficas y evitar la aparición de bandas dobles, lo que sucede por la condensación que ocurre dentro del vial de HS, específicamente en las paredes del mismo y en la porción de la aguja introducida dentro del vial. Esta condensación se da al no presurizar el vial previo a la toma de muestra, ya que el sistema se ve forzado a reponer el equilibrio entre las fases luego de retirar la porción de vapor.

6.3.2.- Condiciones de partida para HS

En base a lo anteriormente descrito se implementó el uso del baño termostático para llevar los viales a una temperatura controlada. La norma ISO-10993-7, recomienda que la temperatura del baño se ubique 10 °C por encima de la temperatura del laboratorio. En este mismo orden de ideas, se construyó un sistema de presurización para los viales de HS, a manera de lograr condiciones de equilibrio más efectivas dentro del sistema.

Para la presurización se tomó una derivación de la línea de nitrógeno que surte al cromatógrafo y se instaló una válvula para regular la presión de salida. Esta tubería fue terminada adjuntándole una punta de jeringa para insulina, a manera de poder introducir el gas en el vial sin afectar significativamente la integridad del septum, ya que dichas puntas son mucho más delgadas que las jeringas desechables comunes.

Aunado a esto se tomó un manómetro y se le adaptó una tubería, adjuntando una punta de jeringa para insulina. El sistema completo puede observarse en la figura 16, donde se miden las presiones dentro de un vial de HS.

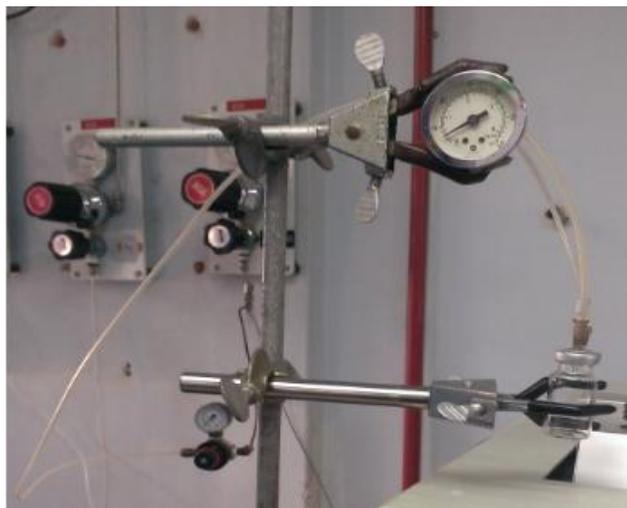


Figura 16.- Sistema de presurización para viales de HS

Adicionalmente se decidió cambiar la inyectora de vidrio que se estaba empleando por una inyectora plástica para insulina, esto con la intención de que la misma presión existente dentro del vial, desplazara el embolo de la inyectora, introduciendo la porción de muestra correspondiente a la totalidad del volumen de la inyectora ($1,0 \pm 0,2$ mL),

Las condiciones de partida para el HS fueron: temperatura de los viales a $37,0 \pm 0,5$ °C, tiempo de equilibrio 10 min, una presión del vial de 1 atm sobre la presión atmosférica, esperando un tiempo de 30 s para la estabilización del sistema HS antes de inyectar al sistema cromatográfico.

Al implementar estas modificaciones y empleando el patrón previamente preparado ($1 \mu\text{g/g}$ de OE y $80 \mu\text{g/g}$ de THF), se realizó la inyección, obteniéndose el cromatograma mostrado en la figura 17.

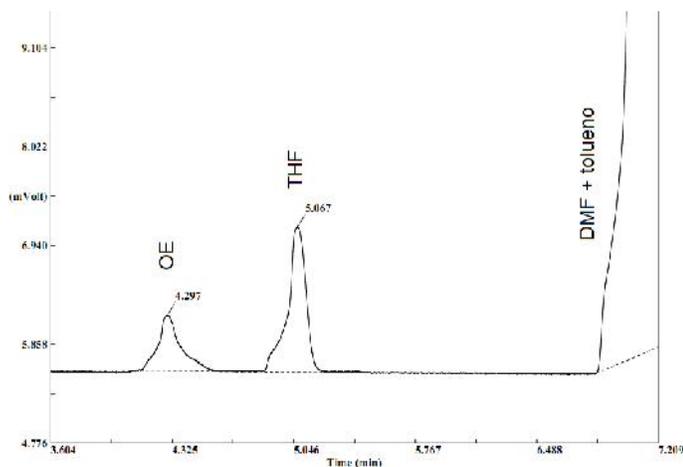


Figura 17.- Cromatograma prueba con vial presurizado y calentado

Se observa la banda de OE a los 4,29 min, desapareciendo del desdoblamiento de la misma, de igual manera el THF a un tiempo de 5,07 min para una corrida total de 12 min. Sin embargo, se puede apreciar una asimetría de las bandas, atribuible al sistema de inyección manual.

6.4.- Optimización del sistema de HS-GC

Una vez comprobada la factibilidad del análisis de OE por HS, en el orden de concentración requerida para el análisis de las muestras, se procedió a optimizar las condiciones cromatográficas y de HS del sistema acoplado.

6.4.1.- Condiciones cromatográficas definitivas

Para realizar este estudio se preparó un nuevo patrón combinado de OE y THF, con concentraciones de 15 y 80 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Estos valores se fijaron como posible punto intermedio de una futura curva de calibración. Empleando las condiciones de HS de partida, se tomaron porciones de 1 mL del HS del patrón previamente preparado, repitiendo el proceso de presurización entre medida y medida y se inyectó en el sistema cromatográfico. Se modificaron los parámetros cromatográficos de manera de lograr una separación óptima entre bandas y minimizar el tiempo de corrida total. Después de una serie de ensayos se optó por las condiciones establecidas en la tabla 22.

Tabla 22.- Condiciones cromatográficas definitivas

Columna	Capilar ; Agilent J&W
Fase Estacionaria	DB-5MS
Dimensiones	60 m x 0,25 mm (ID)
Temperatura de la columna	85 °C
Fase móvil	Nitrógeno
Flujo	1 mL/min
Inyector	Modo Splitless
Temperatura del inyector	200 °C
Temperatura del detector	250 °C
Flujo H ₂	35 mL/min
Flujo Aire	350 mL/min
Flujo N ₂ (make-up)	30 mL/min

Un cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra en la figura 17. Se obtuvo un t_R para el OE de 4,15 min, y para el THF un t_R de 4,66 min, con una corrida total de 11 min.

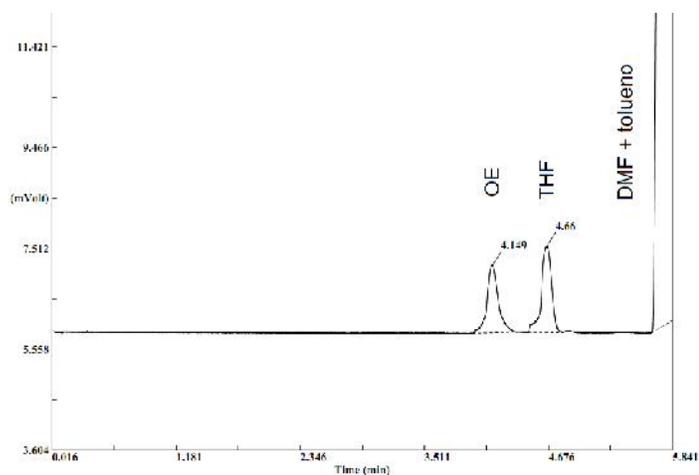


Figura 17.- Cromatograma condiciones cromatográficas definitivas

Antes de proceder a la de optimización de los parámetros de HS, fue necesario e interesante estudiar la precisión del sistema, ya que se empleará un análisis de múltiples variables, donde resultará importante obtener una respuesta confiable en cuanto al valor de área de la banda de OE. Hay que tomar en cuenta, que el indicador para evaluar las condiciones óptimas de cualquier método de medida son las señales absolutas, ya que al emplear señales relativas, como es el caso al medir con respecto un estándar interno, los cambios operacionales son enmascarados por la compensación de la señal.

6.4.2.- Estudio de la precisión de las inyecciones por HS-GC.

En este ensayo se realizaron inyecciones sucesivas del patrón combinado y se evaluó la repetibilidad de las áreas absolutas y relativas. Es de esperar que al inyectar un patrón por HS y esperar que nuevamente se restablezca el equilibrio, la composición de la fase líquida cambie y por consiguiente también la fase de vapor. Es decir, que un mismo patrón no pueda ser usado para medir la precisión y por lo tanto se debe preparar una réplica genuina. Sin embargo, si la cantidad tomada para analizar de fase gaseosa es muy pequeña (en concentración), la composición de la fase líquida prácticamente no es alterada, por lo que un mismo patrón puede ser usado para medir la repetibilidad del análisis. Por lo tanto, este ensayo permitió determinar si la composición del sistema de HS se ve alterada al hacer sucesivas inyecciones de un mismo patrón.

Se realizaron un total de 16 inyecciones sucesivas del HS, correspondiente al patrón anteriormente descrito. Repitiendo para cada inyección el proceso de presurización estipulado anteriormente y bajo las condiciones cromatográficas definitivas. En la tabla 23 se muestran los valores de áreas absolutas y relativas para cada inyección.

Se puede observar que para las áreas absolutas se obtiene un coeficiente de varianza del orden de 4 %, y en áreas relativas del 2 %. El ensayo nos permitió definir que el sistema implementado presenta una repetibilidad aceptable para este tipo de análisis (menor del 5 %). Por otra parte, se comprobó que un mismo patrón puede ser inyectado varias veces para evaluar la dispersión en la medida del mismo.

Tabla 23.- Repetibilidad de las medidas por HS

N° de inyección	Área OE	Área THF	A_{OE}/A_{THF}
1	91869	104965	0,8752346
2	91978	105114	0,87503092
3	98829	111348	0,8875687
4	95812	107531	0,89101747
5	96252	109393	0,87987348
6	98914	110787	0,89283039
7	104334	114372	0,91223376
8	92564	105208	0,87981903
9	104707	119143	0,87883468
10	91222	106279	0,85832573
11	95870	112210	0,85438018
12	99551	116199	0,85672854
13	99474	116896	0,85096154
14	98355	113390	0,86740453
15	101292	118778	0,85278419
16	101989	119769	0,85154756
Promedio	97688	111961	0,87
Desviación	4306	5234	0,02
CV	4,41	4,67	2,01

También es destacable la gran diferencia entre las áreas de las señales aportadas por el OE y el THF, correspondiente a una relación de áreas promedio de 0,87 con concentraciones en disolución de 15 $\mu\text{g/g}$ y 80 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Esta se atribuye a los distintos factores de respuesta al detector y a las desigualdades entre los coeficientes de partición en el HS de ambos compuestos a la temperatura de trabajo.

Seguido a esto, se procedió a buscar y establecer las condiciones óptimas para el sistema de HS.

6.4.3.- Condiciones de HS definitivas

Es importante recordar, como se establece en la revisión bibliográfica, que un sistema de HS tiene ciertas variables que pueden modificar su sensibilidad, como ilustra la ecuación 15:

$$A \propto C_G = \frac{C_0}{(K + \beta)} \quad (15)$$

Es decir, a una concentración fija de analito en la fase líquida del HS (C_0), su área cromatográfica en la fase de vapor (A), va depender del inverso de la suma del coeficiente de partición K y la relación volumétrica de fases β , así como del factor de respuesta del detector, que se considera una constante. Es decir, a menores valores de K y β , mayor A , y por consiguiente mayor sensibilidad.

De la revisión bibliográfica también recordamos que las variables operacionales que afectan el valor de K y de β , son la temperatura y el volumen de fase líquida dentro del vial de HS respectivamente. En función de esto se procedió a estudiar el efecto de estos dos parámetros sobre la señal obtenida de la inyección del HS. Adicionalmente se decidió estudiar cómo afecta al proceso la variación de la presión empleada para presurizar los viales, ya que en principio se podría suponer que utilizar una presión alta, es decir, mayor cantidad de nitrógeno, disminuiría la cantidad de OE disponible en la

fase gas, ya sea por efecto de desplazar analito hacia la fase líquida o por efecto de dilución.

Para ello, se realizó un análisis de variables múltiples, con el software Statgraphics, para las tres variables antes mencionadas. En este caso, el programa arrojó un total de 17 experimentos, a distintos valores de presión, temperatura y volumen de fase líquida, todo esto manteniendo la concentración de OE y THF constante en cada uno de ellos (15 $\mu\text{g/g}$ de OE y 80 $\mu\text{g/g}$ de THF). Los valores de las variables a estudiar, para cada experimento realizado, se resumen en la tabla 24.

Tabla 24.- Experimentos para análisis de múltiples variables

N° de experimento	Temperatura (°C)	Presión (psi)	Peso de fase líquida (g)
1	38	19	20
2	50	8	12
3	50	30	12
4	38	19	15
5	50	8	18
6	26	30	18
7	50	30	18
8	38	19	15
9	58	19	15
10	38	19	15
11	38	0,5	15
12	38	37	15
13	17	19	15
14	26	30	12
15	26	8	12
16	38	19	10
17	26	8	18

Seguidamente se realizaron los 17 ensayos por HS con sus respectivas replicas, y se midieron las áreas absolutas. Los resultados obtenidos para el análisis de múltiples variables se presentan en los gráficos 7 y 8.

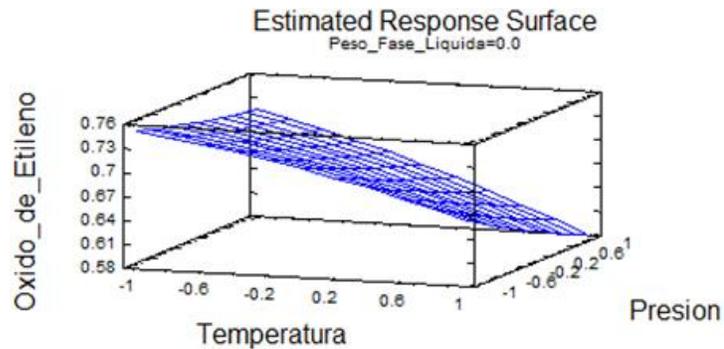


Gráfico 7.- Superficie de respuesta análisis de múltiples variables

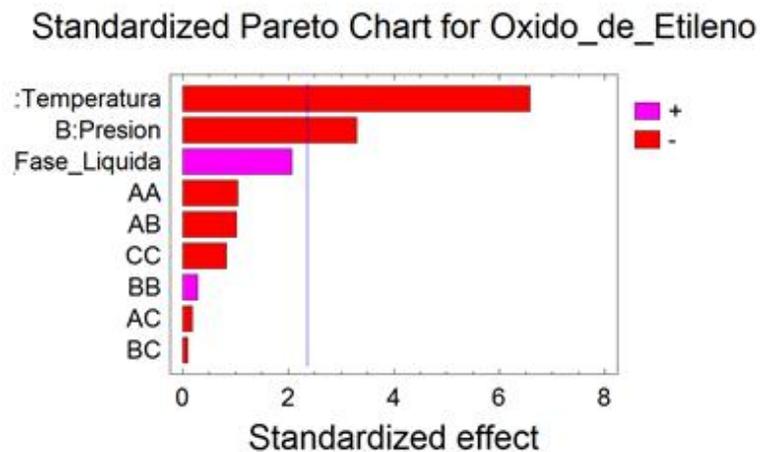


Gráfico 8.- Efecto de las variables sobre el sistema HS

El gráfico 7 representa la superficie de respuesta obtenida, que debería presentar un máximo definido donde se encuentran las condiciones óptimas para el sistema, pero

como se puede observar, en este caso, no se obtuvo un máximo definido, esto puede atribuirse a los cortos intervalos utilizados para la modificación de variables. Hay que destacar que el intervalo empleado para cada caso se escogió de manera comprometida. Por ejemplo, en el caso de la temperatura, no se contaba en el laboratorio con un instrumento adecuado para mantener la temperatura de los viales fija a temperaturas menores a la ambiente y trabajar a temperaturas mayores a 50 °C implicaría salirse del rango recomendado en la literatura. En el caso de la presión se escogió un intervalo que comprende la presión mínima para que el émbolo de la jeringa se mueva y esta pudiese llenarse completamente y la presión máxima que soportan los viales de HS antes de romperse. Finalmente en el caso del volumen de fase líquida, se empleó el peso mínimo para cubrir la cantidad de muestra a tomar según describe la norma y el peso máximo en el que hubiese suficiente volumen de vapor para la toma del HS.

El gráfico 8 refleja el efecto de cada variable sobre el sistema así como la proporción o magnitud en la que afectan al mismo.

El negativo (color rojo) indica que dicha variable contribuye a la sensibilidad del HS aumentándola cuando su valor es menor y el positivo (color violeta) indica que dicha variable contribuye a la sensibilidad aumentándola cuando su valor es mayor. La línea vertical que corta el eje X cerca de 2,5, representa el límite de significación, lo que quiere decir que el parámetro que presente un valor por debajo de este, no aplica un efecto significativo sobre el sistema. En el caso de la temperatura era de esperarse que fuese la de mayor impacto para el sistema porque por lo general, en magnitud, los valores de K para un analito con bajo coeficiente de partición, es decir, buena cantidad en fase vapor (el valor de K oscila entre 10 y 100), son mucho mayores que los de β (en

nuestro caso, llenar un vial con 12 g de fase líquida, daría un valor de β de 0,7 aproximadamente).

También es lógico que la sensibilidad aumente a temperaturas bajas, ya que el punto de ebullición del OE es de 10 °C, lo que indica que a temperatura ambiente su paso a la fase vapor ya es favorecido, mientras que aumentar la temperatura produciría una competencia de disponibilidad en la fase vapor con los demás analitos presentes (THF, tolueno y DMF), ya que la temperatura se acercaría cada vez más a la temperatura de ebullición de los compuestos antes mencionados.

En el caso de la presión era de esperarse que aumentar su valor causara un efecto negativo en la sensibilidad del HS, por lo mencionado anteriormente sobre el efecto que produciría una alta cantidad de nitrógeno dentro del sistema, así que se decidió emplear la presión mínima para que el émbolo de la jeringa se mueva y esta pueda llenarse completamente.

En el caso del volumen de fase líquida era de esperarse que fuese el de menos impacto para el sistema por la gran contribución de K, como se mencionó antes, así como se esperaba que su efecto sobre la sensibilidad fuese positivo, ya que según la literatura, un menor volumen de HS, implica mayor concentración del analito deseado. En este sentido se escogió un volumen de fase móvil que permitiera la toma de fase vapor de manera efectiva. Estos valores definitivos para los parámetros de HS son: Temperatura para etapa de equilibrio de los viales de 26 °C, presión dentro de los viales 8 psi (aproximadamente 0,5 atm sobre la presión natural de los viales) y peso de fase líquida o fase de muestra, de 15 g en total.

Luego de establecidas las condiciones óptimas, tanto cromatográficas como para HS y determinada la reproducibilidad de la inyección para el sistema HS-GC, se procedió a realizar la curva de calibración de OE empleando THF como estándar interno para la cuantificación.

6.5.- Curva de calibración para OE con THF como estándar interno

Para la cuantificación se decidió emplear el método de calibración con estándar interno, para esto se preparó una “batería” de patrones de OE con THF, empleando DMF como disolvente. En cada caso, se tomó los pesos apropiados de cada disolución madre y se prepararon seis patrones en viales para HS, con un peso total de fase líquida de 15 g, como se estableció anteriormente. La concentración de OE en los patrones fue de 0,1; 1; 5; 10; 15; 20; 25 y 30 $\mu\text{g/g}$ de disolución respectivamente, mientras que la concentración de THF se mantuvo en 80 $\mu\text{g/g}$ de disolución en todos los casos.

Luego de preparados los patrones y sellados los viales, se procedió a establecer el equilibrio a temperatura ambiente por un periodo de 24 horas, tal como se estableció previamente. Luego de esto comenzó el proceso de medida, en el que previo a cada inyección se presurizó el vial correspondiente, a la presión previamente establecida. En la tabla 25 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 25.- Datos para curva de calibración

Patrón	mOE/mTHF	A_{OE}/A_{THF}
1	0,00212539	0,15810257
	0,00212539	0,15084824
	0,00212539	0,14711127
	0,00212539	0,15661096
	0,00212539	0,15583727
2	0,01424212	0,20224808
	0,01424212	0,20612625
	0,01424212	0,19591087
	0,01424212	0,20772991
	0,01424212	0,20175189
3	0,06045799	0,32692886
	0,06045799	0,32079984
	0,06045799	0,33332075
	0,06045799	0,33528177
	0,06045799	0,32146036
4	0,12266311	0,58858051
	0,12266311	0,57043341
	0,12266311	0,5743054
	0,12266311	0,57018673
	0,12266311	0,57207578
5	0,18759429	0,69915081
	0,18759429	0,69518093
	0,18759429	0,69729296
	0,18759429	0,70596637
	0,18759429	0,72291094
6	0,24591017	0,9292636
	0,24591017	0,97358653
	0,24591017	0,9323486
	0,24591017	0,92964633
	0,24591017	0,95291
7	0,31321855	1,14385629
	0,31321855	1,13668389
	0,31321855	1,11274964
	0,31321855	1,12636727

Continuación tabla 25

Patrón	mOE/mTHF	A_{OE}/A_{THF}
7	0,31321855	1,08270016
8	0,37404652	1,28560001
	0,37404652	1,30116064
	0,37404652	1,27970773
	0,37404652	1,30343151
	0,37404652	1,26936931

El gráfico 9 se representa la curva de calibración desarrollada para dichos resultados.

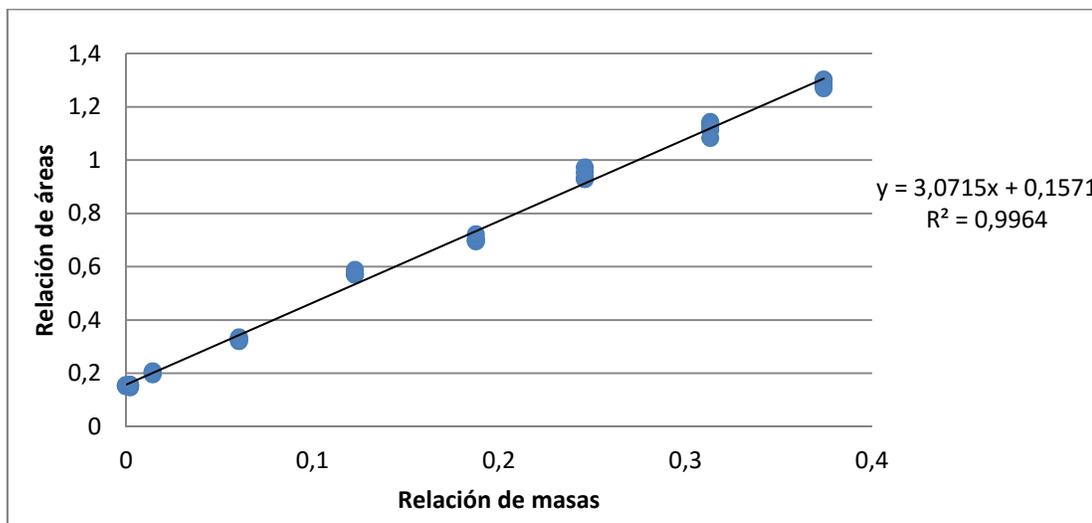


Gráfico 9.- Curva de calibración OE con THF

Se puede observar que existe un comportamiento lineal aceptable de la curva, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9964. También se observa que la curva ajustada por mínimos cuadrados no pasa por el origen, o cerca de mismo. Después de una serie de ensayos se dedujo que era un efecto memoria, motivado al uso de la misma jeringa plástica durante los análisis.

Un pequeño estudio demostró que al realizar una cantidad de medidas con la misma jeringa, la cantidad de OE se queda dentro de la misma alcanza un valor constante. Esto puede ser debido al plástico con el que está hecho la jeringa y la afinidad del OE con el mismo, manteniéndose dentro de la jeringa incluso luego de pasarlo por el limpiador de jeringas con vacío y temperatura. Y la razón por la que esta acumulación alcanza un valor constante, es atribuida a la saturación de sitios activos en la superficie plástica. En esta evaluación se comprobó que para una jeringa nueva, realizar 5 medidas de un patrón de OE no representa una acumulación significativa, por lo que se decidió entonces, de este apartado en adelante, emplear una jeringa nueva para cada patrón o cada muestra.

Considerando entonces que la cantidad de OE retenida en la jeringa se mantiene constante y por razones de ahorro de consumibles (solvente, patrón madre de OE, jeringas, tiempo, entre otros), se decidió mantener esta curva de calibración, pero restándole a cada punto el valor promedio de la señal dada por un blanco medido con la misma jeringa que se midió el resto de los patrones para la curva (0,1537 en relación de áreas promedio).

La nueva curva de calibración se observa en el gráfico 10, donde se puede apreciar que ahora la recta pasa cercana al origen, manteniendo su valor de pendiente y de coeficiente de determinación.

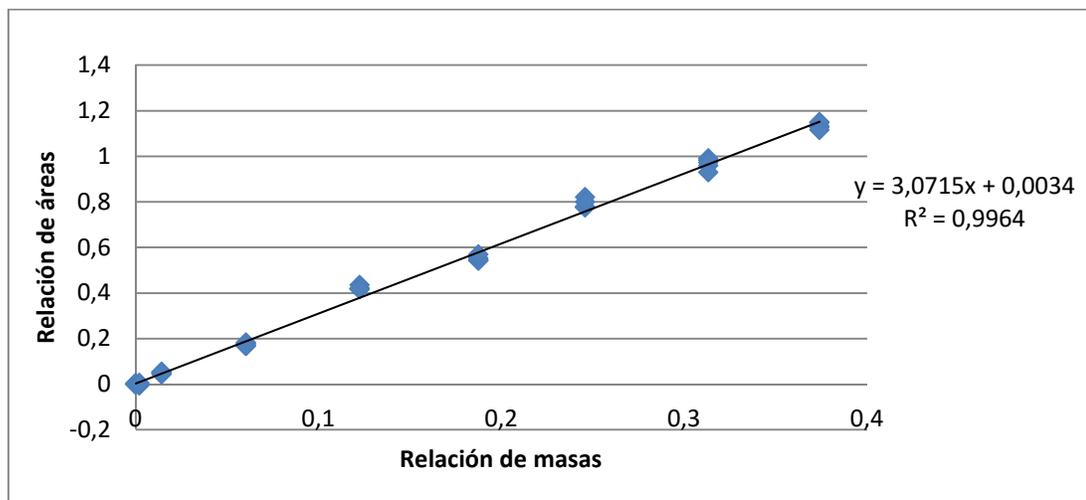


Gráfico 10.- Curva de calibración OE definitiva

Considerando la inhabilidad tanto de preparar una curva de calibración los días de las medidas de muestra por falta de tiempo, como de realizar un estudio estadístico sobre la repetibilidad de la pendiente de la curva realizando réplicas de la curva de calibración en días distintos, se procedió a comprobar la curva de calibración previamente realizada, preparando y midiendo los días de las medidas de muestras, un patrón de OE y THF con concentraciones correspondientes a la curva de calibración. Resultando que la calibración realizada se mantiene sin cambios significativos, al obtener valores de relación de área ubicados dentro de la curva para cada medición.

Teniendo lista la curva de calibración y comprobada la linealidad del sistema, se procedió a la etapa de tratamiento de muestras para la cuantificación del OE residual en los dispositivos médicos recibidos para análisis.

6.6.- Tratamiento de muestras y cuantificación del OE residual

Las muestras para análisis fueron 50 unidades de catéteres torácicos, hechos de PVC, que como estipula la literatura, es uno de los polímeros que absorbe cantidades de media a alta concentración de OE. Las 50 unidades estaban contenidas en un empaque plástico y a su vez cada muestra vino contenida en su empaque plástico sellado, todas identificadas como se muestra en la figura 18.



Figura 18.- Identificación de muestras recibidas

Para el tratamiento de dichas muestras se procedió de la manera descrita en la norma ISO-10993-7, para cada muestra se tomó un catéter completo que fue picado en trozos pequeños para aumentar la superficie de contacto. Los pesos variaron entre 3,0 g y 3,5 g, ya que los catéteres presentan variaciones de peso derivadas del proceso de

producción. Estos fueron pesados dentro del vial de HS y se le agregó la cantidad necesaria de THF para tener una concentración de 80 µg/g de solución y la cantidad de DMF requerida para llevar el vial a un peso de 15 g de fase de muestra.

Por último cada vial fue sellado y dejado a temperatura ambiente durante 24 horas, para la etapa de extracción.

Durante el tratamiento de muestra, se observó que con el avance del tiempo de extracción el plástico absorbía el disolvente, hinchándose hasta el punto de disgregarse y convertirse en un gel, como se puede apreciar en la figura 19.



Figura 19.- Viales con fase de muestra en gel

Considerando esto se realizó un pequeño estudio para evaluar la existencia de algún efecto matriz debido a la formación del gel antes mencionado.

6.6.1.- Estudio del efecto matriz

Este estudio se hizo preparando dos patrones de 8 µg/g OE, el primero con la cantidad estipulada de muestra no esterilizada y el segundo sin muestra. Si no hay efecto matriz la señal de ambos debería ser la misma.

Las medidas para cada vial se realizaron mediante 5 réplicas, determinando la concentración de OE en la solución para cada caso. Estos resultados se muestran en la tabla 26.

Tabla 26.- Prueba para efecto matriz

Muestra	Masa de fase de muestra (g) ($\pm 0,0001$)	A_{OE}	A_{THF}	A_{OE}/A_{THF}	mOE/mTHF	Concentración promedio OE $\pm s^*$ (ug/g)
Plástico	15,5551	64131	206609	0,3103	0,0999	7,7 \pm 0,5
	15,5551	65025	211868	0,3069	0,0988	
	15,5551	60559	182967	0,3309	0,1066	
	15,5551	70176	245834	0,2854	0,0918	
	15,5551	71098	243874	0,2919	0,0938	
Solución	15,0007	63594	201593	0,3154	0,1016	7,7 \pm 0,4
	15,0007	40839	146761	0,2782	0,0894	
	15,0007	51036	174362	0,2927	0,0941	
	15,0007	52802	173754	0,3038	0,0978	
	15,0007	31527	106865	0,2950	0,0949	

*desviación estándar de las medidas

Se puede observar claramente que no existe una diferencia significativa en los resultados obtenidos para cada muestra, por lo que se puede concluir que no hay un efecto matriz producto de la formación del gel entre la muestra y el disolvente.

6.6.2.- Desorción del OE residual en la muestra

Para complementar el trabajo llevado a cabo y realizar una determinación que reflejara una aplicación directa de la metodología desarrollada, se condujo un estudio de la variación de la concentración de OE en las muestras recibidas, con el pasar de los días luego de ser esterilizadas.

Cabe mencionar que las muestras pasaron por un proceso de esterilización como el descrito en los primeros capítulos de este trabajo. Proceso que consta de un ciclo de 18 horas en total, que se lleva a cabo a 47 °C, inyectando en la cámara de esterilización OE al 20 % en CO₂, hasta alcanzar una presión de 0,8 bar sobre la presión natural, aproximadamente. Luego de lo cual, las muestras son sometidas a cuatro ciclos de vacío e intercambio de aire, para ser finalmente extraídas de la cámara y almacenadas en un depósito para la etapa final de aireación.

En este caso las muestras fueron recibidas 50 horas después de haber salido de la cámara de esterilización, momento en el que se inició el estudio de manera inmediata, tomando este tiempo como el inicial para la determinación a realizar.

El proceso se llevó a cabo analizando un total de 18 muestras, preparadas y medidas en un tiempo de 7 días. Para esto se prepararon tres muestras por día, realizando su medición luego de las 24 horas establecidas para la extracción e inmediatamente después de haber preparado la segunda tanda de tres muestras. Esta segunda tanda se midió pasadas las 24 horas de extracción, justo después de preparada la tercera

tanda de tres muestras. De esta misma manera se procedió con el resto de las muestras a analizar.

Luego de la extracción del OE, se presurizó cada vial y se tomó porciones del HS de 1 mL que fueron inyectadas en el sistema cromatográfico, realizando la medida mediante 5 réplicas y repitiendo el proceso de presurización para cada inyección. Las medidas de relación de área fueron promediadas y se determinó para cada caso, la concentración de OE en la muestra, estos resultados se resumen en la tabla 27.

Tabla 27.- Concentración de OE residual en muestras

Día	A_{OE}/A_{THF} promedio	mOE/mTHF	Concentración OE en muestra (ug/g)	Concentración promedio \pm s (ug/g)	CV
1	$0,272 \pm 0,003$	0,08735	24,0508	$23,8 \pm 0,3$	1
	$0,248 \pm 0,009$	0,07970	23,6980		
	$0,246 \pm 0,006$	0,07910	23,5080		
2	$0,193 \pm 0,004$	0,06175	19,20562	$19,2 \pm 0,1$	1
	$0,197 \pm 0,006$	0,06292	19,25547		
	$0,191 \pm 0,004$	0,06100	18,99208		
3	$0,167 \pm 0,003$	0,05317	16,18949	$16,6 \pm 0,3$	2
	$0,18 \pm 0,01$	0,05866	16,82425		
	$0,167 \pm 0,007$	0,05313	16,73946		
4	$0,158 \pm 0,003$	0,05044	15,47567	$15,4 \pm 0,2$	1
	$0,164 \pm 0,006$	0,05219	15,24364		
	$0,169 \pm 0,008$	0,05410	15,59284		
5	$0,151 \pm 0,003$	0,04813	13,81947	$13,8 \pm 0,3$	2
	$0,147 \pm 0,003$	0,04679	13,59036		
	$0,146 \pm 0,009$	0,04640	14,14030		
6	$0,118 \pm 0,008$	0,03725	11,59867	$11,6 \pm 0,3$	2
	$0,130 \pm 0,007$	0,04130	11,65292		
	$0,13 \pm 0,01$	0,04207	11,62706		

En la tabla se puede apreciar que los valores de concentración de OE residual disminuyen con el paso de los días, como es de esperar, pero también se observa que no se llegó al valor mínimo necesitado por la empresa encargada de esterilizar las muestras, que como se estableció antes es de 10 µg/g de muestra. Esto se debió al agotamiento de solvente para la preparación de muestras de la manera adecuada.

También es de notar que los coeficientes de varianza obtenidos para la determinación fueron muy buenos (entre 1 % y 2 %), lo que señala una distribución relativamente uniforme del OE en las muestras analizadas.

Finalmente, el gráfico 11 representa la variación de la concentración de OE residual en la muestra en función del tiempo, que se realizó a manera de observar si esta sigue una cinética de primer orden tal como indica la literatura.

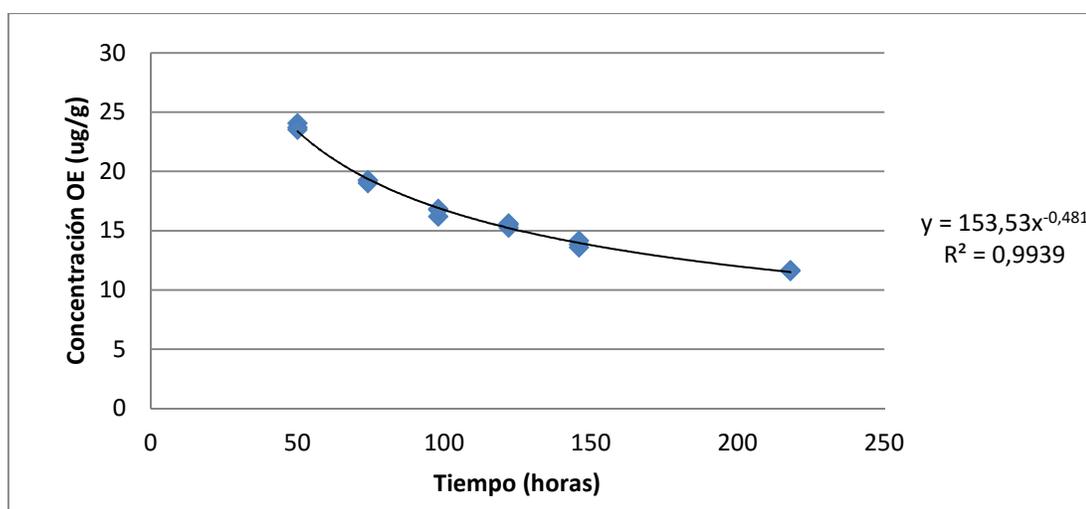


Gráfico 11.- Desorción de OE residual en muestras

Como se puede observar en el gráfico, la distribución obtenida se ajustó de manera aceptable a una regresión de tipo potencial, con un coeficiente de determinación de 0,9939. Mientras que al aplicar una regresión de tipo exponencial, como se describe en los antecedentes estudiados se obtiene un coeficiente de determinación de 0,9239. Por ésta razón se decidió mantener la regresión potencial para la descripción del sistema estudiado, bajo las condiciones de muestras (calibre de las sondas y material del que están hechas), así como condiciones de tratamiento de las mismas previamente establecidas.

Bajo este concepto es posible determinar de manera más confiable, por extrapolación, el tiempo necesario para que la concentración de OE residual en las muestras alcance un valor menor a $10 \mu\text{g/g}$. Aplicando la ecuación obtenida en la regresión potencial, el tiempo de aireación a temperatura ambiente necesario para que la muestra estudiada (sonda Nelaton #10), alcance un valor de concentración menor a $10 \mu\text{g/g}$ y pueda ser distribuida, es de 364 horas, lo que equivale a 15 días.

7.- Conclusiones

- Se desarrolló una metodología analítica por Cromatografía de Gases con sistema de introducción de muestra por Headspace manual (HS-GC), para la determinación de óxido de etileno residual en dispositivos médicos plásticos, como es el caso de los catéteres uretrales de PVC.
- Las condiciones cromatográficas definitivas para la metodología desarrollada son: columna capilar DB-5MS (5 % fenil-metilpolisiloxano) de 60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, temperatura de horno en modo isotérmico a 85 °C. La fase móvil utilizada fue nitrógeno, con un flujo de 1 mL/min, utilizando el inyector en modo splitless a una temperatura de 200 °C y manteniendo el FID a una temperatura de 205 °C con un flujo de nitrógeno de 30 mL/min para el make-up gas. El compuesto escogido como estándar interno para la cuantificación del OE fue el tetrahidrofurano, THF.
- Bajo las condiciones cromatográficas definitivas se obtuvo un tiempo total de análisis de 7 minutos por muestra, donde el OE tiene un tiempo de retención de 4,15 minutos, mientras que el THF presenta un tiempo de retención de 4,66 minutos.
- La repetibilidad de la medida para el sistema cromatográfico y de introducción de muestra, para un solo patrón o muestra, es de 4 % en áreas absolutas, mientras que en área de OE relativa al área de THF este valor es de 2 %.

- Las condiciones óptimas y definitivas de HS son: 26 °C de temperatura durante 24 horas de la etapa de equilibrio o extracción. 8 psi \approx 0,5 atm de presión sobre la presión natural de los viales, para la presurización de los mismos, repitiendo el proceso de presurización para cada inyección. Y por último, 15 g de peso de fase líquida o de muestra.
- La curva de calibración ajustada por mínimos cuadrados arrojó un coeficiente de determinación de 0,996, lo que aunque no representa el valor de linealidad ideal, es un valor considerado como aceptable para el método en cuestión, donde se obtuvo un CV de 2 % en los valores de concentración obtenidos para las muestras empleando dicha curva.
- Se determinó que la acumulación de OE presentada por la jeringa plástica utilizada es un error constante a lo largo de la determinación de la curva de calibración, debido a la afinidad del OE con el plástico de la inyectora. Por lo que se decidió utilizar dicha curva restando el valor promedio del blanco a cada medida de patrón, fijando entonces el uso de una jeringa nueva para la medida de cada muestra.
- Se determinó que no existe efecto matriz por la formación del gel entre el plástico de las muestras y el solvente utilizado para la extracción.
- La concentración de OE residual en las muestras analizadas (sondas Nelaton #10) fue de: $23,8 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ para el día 1; $19,2 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ para el día 2; $16,6 \pm$

0,3 µg/g para el día 3, $15,4 \pm 0,2$ µg/g para el día 4; $13,8 \pm 0,3$ µg/g para el día 5 y $11,6 \pm 0,3$ µg/g para el día 6.

- Al graficar los resultados de concentración de OE residual en función del tiempo en horas, se generó una curva descrita de la manera más adecuada por una distribución de tipo potencial, teniendo un coeficiente de determinación de 0,9939.
- El tiempo de aireación a temperatura ambiente necesario para que este tipo de muestra alcance la concentración de OE máxima permitida para la distribución del material, se obtuvo por extrapolación y es de 364 horas, lo que equivale a 15 días.

8.- Recomendaciones

- Se recomienda utilizar un automuestreador de HS para la introducción de muestra y así disminuir la dispersión que se encuentra entre medidas para la inyección manual, disminuyendo así los coeficientes de varianza. Permitiendo a su vez, el trabajo con áreas absolutas y calibración externa sin necesidad de emplear un estándar interno, facilitando el proceso.
- En caso de mantener el sistema de introducción de muestra manual, se recomienda emplear una inyectora para cada patrón o muestra a medir, a manera de no introducir el error por acumulación de OE en el plástico de la misma.
- Se recomienda el uso de un termostato que funcione a temperaturas menores a la ambiente, para favorecer un aumento en la sensibilidad del HS para el OE en este caso.
- Se recomienda aplicar un nuevo estudio de desorción de OE residual si se desea aplicar el análisis a otro calibre de catéter o a otro tipo de muestra.
- Con las sugerencias anteriores, es posible modificar las condiciones de trabajo para extender el análisis a otro tipo de dispositivo medico donde se desee determinar OE residual.

9.- Bibliografía

[1] Gestal Otero. **Riesgos del Personal Sanitario**. 2da edición, editorial Interamericana- McGraw-Hill, España, año 1999.

[2] Negretti G. **Residuales de la esterilización con óxido de etileno en equipos médicos**. Boletín Biolene n° 28, Argentina, año 2009.

[3] Gutiérrez S. **Métodos de esterilización**. Laboratorio de microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, año 2008.

[4] Grupo del sector del óxido de etileno y sus derivados. **Directrices para la distribución de óxido de etileno**. CEFIC (Consejo europeo de federaciones de la industria química), tercera revisión, año 2004.

[5] García M., Paz M. **NTP 470: Óxido de etileno: prevención de la exposición en hospitales**. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo, Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España, año 1999.

[6] Arana D., Blanco C., Caldés A. **Agentes químicos en el ámbito sanitario**. Escuela Nacional de Medicina del Trabajo (ENMT), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, año 2010.

[7] Norma COVENIN 2843-91. **Esterilización con óxido de etileno**. Venezuela, año 1991.

[8] Acosta-Gnass S., Andrade V. **Manual de esterilización para centros de salud**. Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C.-USA, año 2008.

[9] Mortimer V., Kercher S. **Control technology for ethylene oxide sterilizations in hospitals**. Departamento de salud y servicios humanos, Ohio-USA, año 1989.

[10] Giordano S. **Óxido de etileno: agente esterilizante C₂H₄O**. Boletín Biolene n° 38, Argentina, año 2011.

[11] The USA Food and Drug Administration. **Ethylene oxide, ethylene chlorohydrine, and ethylene glycol: Proposed maximum residue limits and maximum levels of exposure**, Departamento de salud, educación y bienestar, USA, año 1978.

[12] Skoog D., Holler J., Nieman T., **Principios de Análisis Instrumental**, Editorial Mc Graw Hill, 5º Edición, España, Año 2010.

[13] Harris D., **Análisis Químico Cuantitativo**, Editorial Reverté, 3º Edición, Barcelona – España, Año 2007.

- [14] Barquero M., ***Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases***, 1º Edición, Editorial Serie Química, Costa Rica, Año 2006.
- [15] Agilent Technologies, ***Guía de selección de columnas para cromatografía de gases***, Alemania, Año 2007.
- [16] Kolb B., Ettre L., ***Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice***, Editorial Wiley – VCH, Canadá, Año 1997.
- [17] Restek, ***A Technical Guide for Static Headspace Analysis using CG***, USA, año 2000.
- [18] Marlowe D., Lao N., ***Interlaboratory comparison of analytical methods for residual ethylene oxide in medical device materials***, Rockville-USA, año 1987.
- [19] Lao N., Lu H., ***Interlaboratory comparison of analytical methods for residual ethylene oxide at low concentration levels in medical device materials***, Rockville-USA, año 1995.
- [20] Ruíz M., Rosso A., Fraga I., ***Validación de la determinación de óxido de etileno residual en dispositivos biomédicos***, CISCOE Parque tecnológico Miguelete, Argentina, año 2000.

[21] Lucas A., Merrit K., Hitchins V., ***Residual ethylene oxide in medical devices and device material***, USA, año 2003.

[22] Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, ***Determinación de la concentración residual de óxido de etileno en ELSANEK®***, Informe técnico, unidad de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España, año 2007.

[23] Norma ISO-10993-7, ***Biological evaluation of medical devices-Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals***, Estándar internacional, año 2008.

[24] Segui M., ***Dosaje de residuos de óxido de etileno***, servicio de esterilización, Hospital Central Mendoza, Argentina, 2009.