

# ESTÁNDAR DE REFERENCIA PARA MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TPO

Autor: Georges Schmidt, Product Manager Orbisphere Hach

La búsqueda de un estándar de referencia para TPO (oxígeno total en el envase) aún continúa abierta, a pesar del amplio uso de métodos y dispositivos que miden este importante parámetro en la industria cervecera. Hoy en día, el TPO es uno de los únicos parámetros entre las herramientas fundamentales del analista de cerveza que no tiene estándar.

A continuación, se describe un nuevo método para crear un estándar TPO y se compara éste con otros métodos. Este nuevo estándar se utiliza después para evaluar las mediciones de TPO mediante métodos existentes.

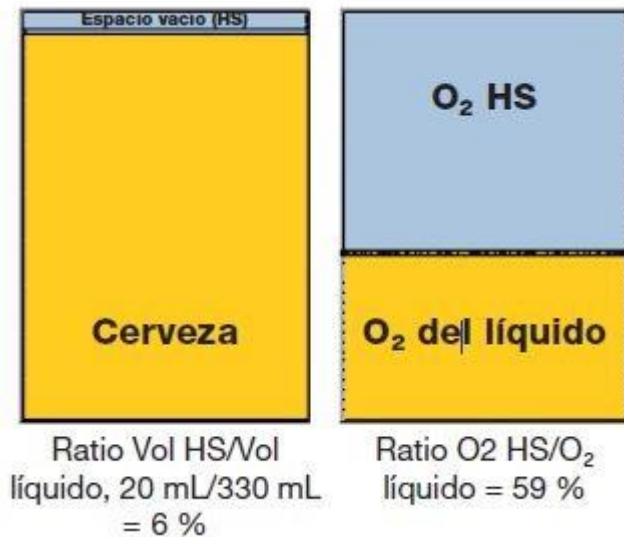
El oxígeno se considera un parámetro esencial que afecta al perfil de frescura de la cerveza envasada.

En 1984, K. Uhlig y C. Vilachá [1] publicaron un artículo que supuso un gran avance por varias razones:

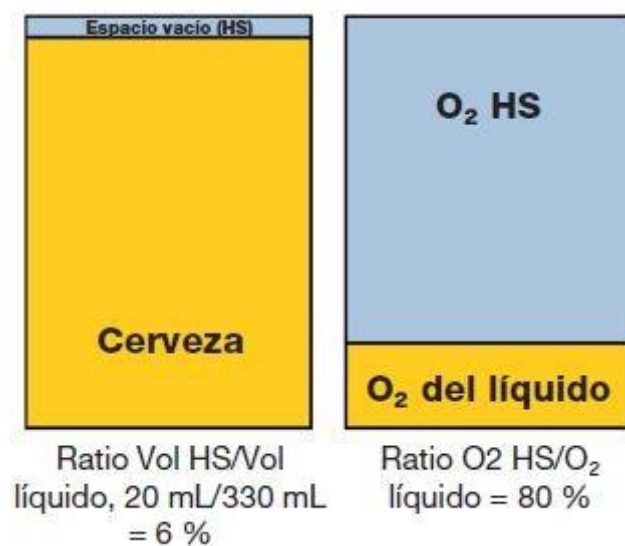
- El cambio de la medición de aire por la medición de oxígeno
- El cambio del uso de reactivos por el análisis con instrumentos modernos
- La mejora del límite de detección inferior a unos pocos ppb, cuando anteriormente solo podía determinarse en torno a 1 ml de aire (que corresponde a 270 ppb de TPO)

25 años después, se dio otro paso importante cuando los fabricantes de instrumentos crearon analizadores específicos para TPO.

**De entre todos los métodos, se comprobó que la inyección de aire proporcionaba los mejores resultados.** La fiabilidad de este método se demostró en combinación con el nuevo analizador Orbisphere 6110 de Hach, vamos a explicarlo.



La figura 1 muestra una lata de 330 ml a 8°C en equilibrio y con 20 ml de volumen de espacio vacío.



La figura 2 muestra el ejemplo de una lata justo después del envasado, mucho antes de haber alcanzado el equilibrio interno.

Las áreas amarillas y azules muestran el volumen de cerveza y de espacio vacío con el contenido de O<sub>2</sub> asociado. El cálculo de la figura 1 se realizó con el factor Z. La proporción de cada superficie coincide con la relación entre volúmenes y contenidos de oxígeno en cada fase.

La paradoja del TPO reside en que la ubicación principal del oxígeno en el envase se encuentra en el volumen más pequeño: el espacio vacío.

En un principio, las propiedades físicas del oxígeno explican este fenómeno. Siendo 30 veces menos soluble que el CO<sub>2</sub>, el oxígeno permanece en la fase gaseosa, con una concentración de acuerdo con la temperatura del líquido y las proporciones de los volúmenes. Esto se muestra en la figura 1.

Cualquier variación del volumen del espacio vacío tiene un efecto importante sobre el TPO; un aumento de 10 ml en el volumen de espacio vacío provoca un aumento de TPO del 9%.

### **Requisitos para un estándar para TPO**

La identificación de la aptitud para el uso de un nuevo estándar para TPO se evaluó de acuerdo con los siguientes criterios [2]:

- Precisión (veracidad)
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Rango
- Facilidad de implementación (se puede realizar en cualquier lugar, laboratorio y planta de producción; no depende del operador)

### **Principios de los estándares para TPO evaluados**

El objetivo principal del estándar para TPO es tener una cantidad conocida de oxígeno en un envase con una incertidumbre conocida.

Muchos métodos potenciales están basados en la introducción de una cantidad conocida o desconocida de aire en el espacio vacío del envase. En los análisis químicos, este método también se llama SAM (Método de adición estándar) [3].

Antes de la inyección de aire, se analiza un lote de blancos (cervezas viejas con niveles bajos de oxígeno). El valor final esperado es la suma de la concentración de TPO en el blanco más el aire añadido.

### **Posibles soluciones para estándares TPO**

#### Purga de aire en el espacio vacío

Las botellas están preparadas en una cabina con una atmósfera de oxígeno controlada. Este método ofrece una buena veracidad y repetibilidad, pero

requiere dispositivos especiales y tiempos de purga largos. Esto tiene un efecto negativo en la facilidad de la implementación.

#### Latas de referencia con agua

Se toma un lote de latas de agua carbonatada de un dispositivo de llenado con un rendimiento conocido en cuanto a la absorción de aire. Se mide una parte del lote y se determina la distribución estadística de TPO.

Es un método sencillo de implementar, pero no se puede identificar la precisión. Este método fue evaluado inicialmente por ASBC en 2004 y después fue descartado [4].

#### Inyección de aire en la espuma de botellas abiertas

Con cuidado, se retira el tapón de una botella de cerveza pasteurizada. Se golpea suavemente el lateral de la botella con una varilla sólida para provocar que suba una gran cantidad de espuma a la parte superior de la botella. Se inserta una jeringa de aire en la espuma y se inyecta el contenido. Inmediatamente después se coloca una tapa corona en la botella y se sella.

Este método también fue evaluado por un subcomité [4] de ASBC y fue rechazado en 2007 después de un ensayo inter-laboratorio. Se considero que la repetibilidad y las diferencias entre los laboratorios quedaban fuera de los límites aceptables.

#### Inyección de aire en el espacio vacío

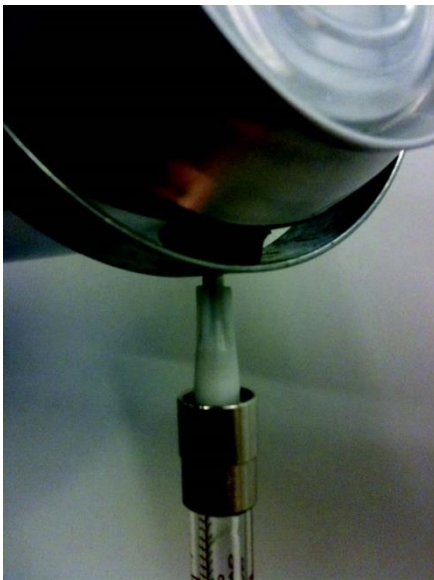
Es una variante de método inicial de ASBC descrito anteriormente. En este método se sustituye la tapa corona por otra diferente que incluye un diafragma [5]. Este método ofreció una repetibilidad y una reproducibilidad con una proporción de desviación estándar/promedio del 28%. Debe prepararse especialmente una tapa corona específica. Se halló una precisión del 80% con el método de análisis estándar para TPO, lo que significa un error del 20%.

#### El nuevo método: inyección de aire en latas

Una variante de este método fue mencionada por el subcomité de ASBC en la conclusión de su informe final de 2007 [5]. Se inyecta una cantidad conocida de aire en una lata de aluminio en la que se ha colocado previamente un septo de goma en el lugar de la inyección, el septo se mantiene en su ubicación con una abrazadera de gran diámetro.

Después de 4 años de uso, este método ha proporcionado buenos resultados. La preparación de la muestra es sencilla y este método permite la inyección de casi cualquier cantidad de aire en la lata. Por lo tanto, ofrece una solución para los criterios de precisión, linealidad y repetibilidad.

Se utilizan latas estándar de cerveza vieja, y el tiempo necesario para la preparación y la facilidad de implementación son aceptables.



### Métodos de evaluación

La tabla 1 muestra la evaluación de todos los métodos considerando diferentes criterios.

Criterios	Lata de referencia con agua	Purga de aire en el espacio vacío	Inyección de aire en la espuma	Inyección de aire en el espacio vacío	Inyección de aire en la lata
Precisión (veracidad)	☺	☹	●	●	●
Repetibilidad	☹	☹	●	●	●
Reproducibilidad	☹	☺	●	☹	●
Rango	○	☺	●	●	●
Facilidad de implementación	●	○	☹	☹	☹

*Tabla 1: Comparación de diferentes estándares de TPO*

## **Método de inyección de aire utilizado con el analizador de TPO Orbisphere 6110**

El Orbisphere 6110 mide O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y el volumen de espacio vacío con el contenido de gases tanto en el espacio vacío como en el líquido. El sistema utiliza una técnica de muestreo de gas patentada.

La repetibilidad de las muestras medidas tras la inyección de aire de 170 ppb con un mismo analizador y un mismo operario, resultó de  $\pm 20$  ppb, bajando hasta  $\pm 2$  ppb cuando el operario era experimentado.

El parámetro de proporción de recuperación se utiliza como una rutina de validación estándar. La recuperación es la proporción (O<sub>2</sub> medido)/(O<sub>2</sub> inyectado) y debería ser idealmente de 100 %.

El proceso completo de medición es automático, y la ausencia de contacto entre los sensores y el líquido minimiza los requisitos de mantenimiento, garantizando un funcionamiento consistente del equipo y la fiabilidad de los resultados.

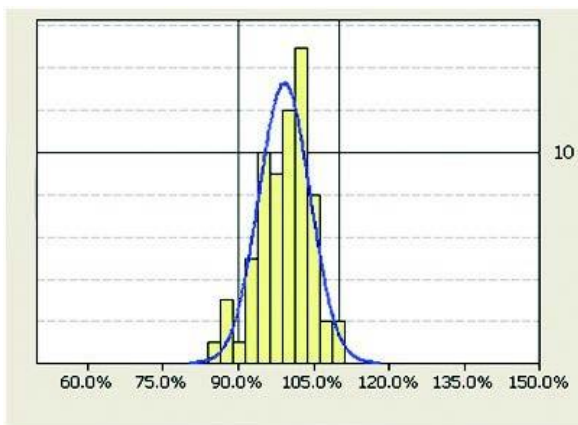
La recuperación media hallada fue excelente, a 99,2 % (159 ppb) y con una desviación estándar de solo  $\pm 5$  %.

Para un intervalo de confianza de 95 %, se obtuvieron mediciones de entre 144 ppb y 176 ppb.

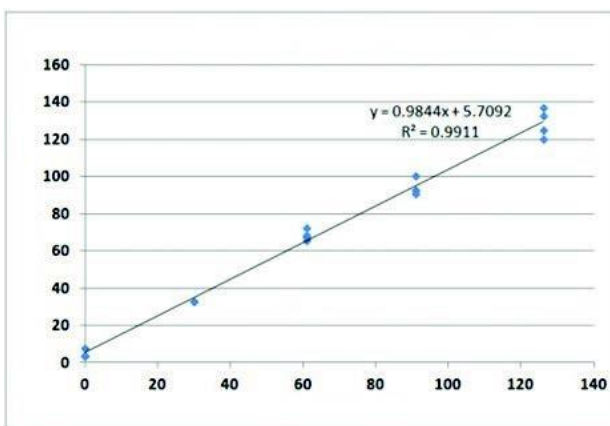
La validación de linealidad se suele realizar durante la puesta en marcha. Se muestra un ejemplo en la figura 6 con un coeficiente de determinación R<sup>2</sup> a 0,99 que demuestra la excelente linealidad del método de inyección de aire y el analizador.



**Fig. 4** Analizador Orbisphere 6110



**Fig. 5** Histograma de recuperación en los analizadores Orbisphere 6110



**Fig. 6** Validación de linealidad en la práctica con inyección de aire en latas

## **Ventajas del nuevo método de referencia para TPO**

Los datos procedentes de los test colaborativos aún no están disponibles, pero cientos de inyecciones de aire realizadas en diferentes centros han demostrado que este método proporciona un grado de confianza mayor con cualquier analizador de TPO o método de análisis de TPO.

Otras ventajas de la nueva referencia para TPO son:

- La identificación de la incertidumbre de los equipos utilizados para el control de calidad después del envasado.
- La evaluación del rendimiento en el laboratorio mediante estudios colaborativos y comparativos.
- Una mejor gestión de la producción fuera de las especificaciones. Será posible gestionar el cumplimiento de las especificaciones del producto mediante el uso de una zona de rechazo, en lugar de un límite fijo único como se suele utilizar en la actualidad [6].

## **El análisis estándar de TPO y sus limitaciones**

Contar con una referencia sólida para TPO ofrece la capacidad de evaluar el rendimiento del método estándar para el análisis de TPO.

Se han encontrado diferencias en el laboratorio y en varias plantas entre el método de análisis estándar para TPO y el 6110. No obstante, la referencia para la inyección de aire confirmó que el 6110 ofrecía los resultados correctos. El método estándar para TPO se basa en el supuesto de que se alcanza un equilibrio completo del envase después de 5 minutos. Esto no siempre es así y la brecha entre la teoría y la práctica se debe a factores clave como:

- Los volteadores de botellas se sustituyen por agitadores horizontales
- El tiempo de equilibrio no es el mismo para las botellas y para las latas
- La espuma del interior de envase reduce la generación de turbulencia
- Efectos de la matriz, con o sin captadores de oxígeno, que afectan el oxígeno disuelto en el transcurso del tiempo



## **Conclusión final**

La inyección de aire en latas como referencia de TPO ofrece un progreso significativo en comparación con otros métodos. Sus principales ventajas son el gran rendimiento y la facilidad de uso e implementación.

Otra ventaja del método de inyección de aire es que imita el mismo proceso de contaminación del aire durante las operaciones de llenado, con la contribución principal de oxígeno al espacio vacío. Por consiguiente, la validación de un método para TPO se realiza con un envase con condiciones muy similares a las encontradas tras el proceso de llenado.

El método de inyección de aire también ha puesto de manifiesto las limitaciones del análisis estándar para TPO, en el que la medición del oxígeno disuelto tras un supuesto equilibrio perfecto da lugar a la subestimación del TPO en muchos casos.

La razón es la dificultad para conseguir la transferencia de oxígeno correcta desde el espacio vacío al líquido; el equilibrio casi nunca se alcanza completamente. Como entre el 60 % y el 90 % del TPO está localizado en el espacio vacío, la medición del menor contenido de oxígeno en el líquido se expone a una mayor incertidumbre cuando se aplica el factor Z.

La identificación del rendimiento de la nueva referencia para la inyección de aire se ha hecho posible con el Orbisphere 6110, que no necesita equilibrado previo.

Por último, el uso de una referencia sólida para el estándar de TPO también ayudará en la transición de los dispositivos existentes que utilicen el método estándar a los nuevos analizadores de TPO.

## **Referencias**

[1] Vilachá C., and Uhlig K. The measurement of low levels of oxygen in bottled beer. Brauwelt Int. 1985, Vol. 1, pp. 70-73

[2] Eurachem. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods.

A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1st edition. 1998

- [3] Morrison, George H. General aspects of trace analytical methods 1. Methods of calibration in trace analysis. s.l.: IUPAC Chemistry, 1975. pp. 395-402. Vol. 41
- [4] ASBC Subcomitee. Method for Reference Standard for Total Package Oxygen. s.l.: ASBC, 2004
- [5] ASBC subcomitee. Method for reference standard for total package oxygen.s.l.: ASBC, 2007
- [6] Carolina Wehrmann, Carlos De Amorín, Carsten Zufall. A novel method for interlaboratory analysis of TPO. 201 1, Vol. 69(4), pp. 267- 272