

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA
CROMATOGRÁFICA (GC/FID) PARA LA DETERMINACIÓN DE 19
CONGÉNERES (< 50 ppm) EN ALCOHOL EXTRA NEUTRO RECTIFICADO
EMPLEADO PARA LA PREPARACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS EN LA
INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA**

VICTORIA EUGENIA RECALDE ROJAS

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2010**

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA
CROMATOGRÁFICA (GC/FID) PARA LA DETERMINACIÓN DE 19
CONGÉNERES (< 50 ppm) EN ALCOHOL EXTRA NEUTRO RECTIFICADO
EMPLEADO PARA LA PREPARACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS EN LA
INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA**

VICTORIA EUGENIA RECALDE ROJAS

**Trabajo de grado en Modalidad de Pasantía, presentado como Requisito
Parcial para optar al título de Químico**

**Director: FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO, *MS.c.*
Codirector (I.L.C): LIBARDO ANTONIO ARCE, Ing. Químico**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2010**

Nota de Aceptación

Director _____
FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO, *MSc.*

Jurado _____
EDIER HUMBERTO PÉREZ, *Dr.*

Jurado _____
RENÉ ZUÑIGA RENGIFO, *MSc.*

Fecha de sustentación: Popayán 20 Diciembre 2010

DEDICATORIA

A mi madre **ALBA LUISA ROJAS**, quien fue mi motor y el principal motivo de lucha para salir adelante porque es un ejemplo de perseverancia y la mejor madre del mundo. Le doy gracias a Dios porque gracias a ella soy una mejor persona por sus consejos y enseñanzas.

Mi hijo **SANTIAGO**, quien alegró mi vida para siempre y por quien seguiré adelante para darle lo mejor.

A mis hermanos **CARLOS, DAVID y JOSÉ LUIS**, a quienes adoro y fueron inspiración para luchar por lo que quiero, gracias por su apoyo, confianza y amor.

A **JOHANNA SÁNCHEZ** por su verdadera amistad incondicional, por su lealtad y por ser la mejor amiga del mundo.

A **LILA** por brindarme una amistad sincera, apoyo en las buenas y en las malas, eres una gran persona.

A **DIEGO** por enseñarme diferentes maneras de ver y disfrutar la vida.

A mi equipo de “**FÚTBOL SALA UNICAUCA**” quienes han sido unas personas maravillosas conmigo, y me siento feliz por tener amigos tan estupendos como ellos a mi lado. Los quiero mucho. Gracias por permitirme compartir tantos momentos felices y de triunfo.

A alguien muy especial, **ROBERTO**, a pesar de todo, muchas gracias por lo que hemos compartido y sabes que estarás en mi corazón por siempre. TE AMO.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi director, el profesor **Fernando José Hernández Blanco** por hacer posible esta tesis y por compartir sus conocimientos dedicación y la paciencia necesaria conmigo en el desarrollo de este proyecto.

A mi codirector **Libardo Arce** por su colaboración, por escucharme y por darme su enseñanza en el área de Control de Calidad.

A Camilo Moreno por ofrecerme sus conocimientos a pesar de la distancia.

A mis compañeros Farid, Juan Pablo, Yohanna, Yuri, Ángela, Ana María, Lisbeth, Vicky.

A mis jurados y profesores

A todos los profesores del Departamento de Química gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mis compañeros

Gracias

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la obtención del alcohol, etílico por fermentación de mieles o melazas de caña de azúcar, se generan sustancias volátiles denominadas congéneres tales como: aldehídos, ésteres, alcoholes superiores (isobutílico, isoamílico y homólogos) y furfural, además del metanol; que son separados del alcohol por procesos de destilación y rectificación y de los cuales queda muy poca cantidad en el alcohol extra neutro que difieren en su proporción según el tipo de bebida que se quiere preparar. Estos congéneres varían según el origen de los azúcares fermentados (mosto, remolacha azucarera, restos agrícolas, caña de azúcar, cereales, entre otros) y la actividad biológica de las levaduras. Estas sustancias en concentraciones elevadas (superior a una concentración de 80 mg/L) pueden resultar altamente tóxicas. La cantidad presente de estos subproductos en la bebida alcohólica dependerá de: El origen del alcohol utilizado en su elaboración, el tipo y calidad del proceso de destilación y la concentración de ese alcohol en la bebida. La concentración de estos compuestos debe estar por debajo de 80 mg/L que es la cantidad máxima permitida según la NTC 411 para que el producto pueda ser distribuido comercialmente. Las repercusiones del aumento o disminución en la concentración de estos compuestos involucran cambios en el aroma y el gusto particular que presentan las bebidas alcohólicas.

Debido a que el alcohol tiene un alto impacto en la elaboración de aguardiente, por su manipulación, almacenamiento y uso, se debe atender la calidad de éste. La Industria Licorera del Cauca (*I.L.C.*) compra el alcohol (extra neutro rectificado) y procede a verificar antes de realizar la recepción del alcohol, que cumpla con las disposiciones descritas en la Norma Técnica Colombiana (NTC 4118) donde se menciona la presencia de congéneres a una concentración (máximo 80 ppm). Una vez verificado el cumplimiento de esta norma, se informa que la calidad del producto cumple con las condiciones necesarias para ser utilizado en el proceso de fabricación del aguardiente Caucaño, el cual finalmente es sometido a análisis para determinar sus características fisicoquímicas y organolépticas.

La Industria Licorera del Cauca requiere la obtención de resultados altamente confiables sobre congéneres presentes en alcohol extra neutro rectificado para autorizar la elaboración de las bebidas alcohólicas específicamente tipo aguardiente y cumplir con los requerimientos exigidos por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC) en la Norma Técnica Colombiana (NTC 4118)¹.

¹ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC) 4118, Bebidas Alcohólicas. Determinación de Metanol y de Congéneres en Bebidas Alcohólicas y en Alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de Gases., editada por el *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)*, p. 1 – 12.

Por esta razón, se implementó y estandarizó una técnica por cromatografía de gases usando detección de ionización de llama (GC/FID) para cualificar y cuantificar congéneres en concentraciones pequeñas (menores a 50 ppm según lo requerido por la Industria Licorera del Cauca) en sus bebidas alcohólicas. La técnica (GC/FID) es una de las más aplicadas en la determinación de compuestos volátiles, porque posee una buena sensibilidad (aproximadamente 1×10^{-3} ppm), presenta alta selectividad, fácil de utilizar, buena estabilidad, reproducibilidad y permite determinar cantidades traza en partes por billón y partes por trillón (ppb, ppt) para determinados compuestos presentes en el alcohol.

2. INTRODUCCIÓN

En Colombia se denomina “bebidas alcohólicas” a las sustancias que se obtienen por un proceso de destilación de productos fermentados y que pueden contener sustancias aromáticas en alcohol rectificado neutro con edulcorantes o colorantes permitidos. Para que las bebidas alcohólicas puedan ser distribuidas al consumo humano deben cumplir con la Norma Técnica Colombiana² (NTC 4118). Que considera la concentración final sustancias volátiles o congéneres permitidos presentes en las bebidas alcohólicas destiladas de los compuestos volátiles tales como: aldehídos, furfural, ésteres y alcoholes superiores excluyendo los alcoholes etílico y metílico.

Los métodos clásicos para la determinación de congéneres los cuales son reportados en la Norma Técnica Colombiana (NTC 411)³ en la actualidad son:

Aldehídos: Para determinar este tipo de congéneres se usa normalmente, el método de Volumetría Redox, donde la muestra se somete a un proceso de destilación y al destilado se adiciona bisulfito de sodio (Na_2SO_3) y por yodometría, se determinan los aldehídos; que se expresan como mg de acetaldehído por L de alcohol anhidro.

Ésteres: Se realiza por volumetría ácido–base en el cual se destila la muestra y en el destilado se determinan los ésteres por saponificación con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH). Los resultados se expresan en mg de acetato de etilo por L de alcohol anhidro.

Alcoholes Superiores: Para la determinación del contenido de alcoholes superiores se utiliza la técnica espectrofotométrica que se basa en la coloración roja que producen éstos alcoholes (isobutílico, isoamílico y homólogos) cuando se tratan con dimetil-amino-benzaldehído en medio sulfúrico; se lee la absorbancia en un rango de 538- 543 nm en un espectrofotómetro y se compara con un patrón en las mismas condiciones. Los resultados se expresan como mg de alcoholes superiores por L de alcohol anhidro.

² *ibid.*, p. 21

³ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC) 411, Bebidas Alcohólicas Anís o Anisado., editada por el *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)*, séptima actualización p. 1 – 10.

Furfural: En la determinación del contenido de furfural, el método consiste en tratar una alícuota del destilado con anilina incolora en medio ácido a 15 °C. El color desarrollado por la muestra se compara con un blanco correspondiente a una solución hidroalcohólica exenta de furfural y con la misma concentración de alcohol que la muestra.

De acuerdo con lo anterior, una de las técnicas analíticas comúnmente utilizadas y las cuales son reportadas en la NTC 411 son las de espectrofotometría, donde se aprovecha el fundamento basado en la absorción de la radiación ultravioleta, visible e infrarroja de una molécula. Esta técnica tiene variables que influyen en la determinación de cada analito como son: La naturaleza del disolvente, el pH de la disolución, la temperatura, la concentración del electrolito, la presencia de sustancias interferentes que conllevan a un margen de error alto. La sensibilidad de estas técnicas no es muy buena y permiten un límite de detección de ppm. Por ejemplo, una de las dificultades que presenta esta técnica en la determinación de alcoholes superiores es su poca selectividad debido a que en el rango de longitud de onda trabajado, varias moléculas pueden absorber (el n propanol y el alcohol isoamílico absorben en un rango de longitud de onda de 540 a 570 nm) y las interacciones electrónicas específicas que se pueden presentar entre ellos, generan interferencias que perjudican los resultados, es decir, no son confiables.

Con respecto a los otros métodos, se presentan problemas de contaminación de solventes y los métodos son altamente imprecisos; además el gasto de reactivos es alto. Esto, repercute en la reproducibilidad debido a que hay muchas variables que afectan el proceso que impide una buena precisión. Por lo tanto es necesario generar métodos donde los niveles de respuesta sean altamente confiables.

La NTC 4118² establece parámetros y condiciones de operación del método por cromatografía empleado en la determinación cuantitativa de metanol y congéneres, tanto en las bebidas alcohólicas (con excepción de la cerveza), como en el alcohol etílico empleado en su elaboración. A continuación se mencionan algunas características que exige la norma: Por ejemplo, se debe utilizar un Cromatógrafo de Gases con detector de ionización de llama. Opcionalmente, puede emplearse una de las siguientes columnas: Columnas empacadas entre las cuales están la Carbowax 1500 a 0,2 % sobre Carbopack C 180 – 100, de 182,88 cm. (6 pies) de longitud, 3,2 mm (1/8 de pulgada) de diámetro, en acero inoxidable; la columna Carbowax 20M a 5% sobre Carbopack B 80 – 120, de 2 m de longitud, de 2 mm de diámetro interno. Y las columnas capilares como por ejemplo, con una fase estacionaria compuesta por 5% Fenil Metil Siloxano, de 50 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,52 µm de espesor de capa; se encuentra también con el mismo tipo de fase estacionaria que la anterior, pero más corta (30 m de longitud), y con 0,53 mm de diámetro interno y 2,65 µm de espesor de capa. También menciona la columna con fase estacionaria de Polietilenglicol (PEG) de 25m de longitud, 0,20mm de diámetro interno, 0,30 µm de

espesor de capa. La Carbowax 20M enlazada de Sílica fundida de 25 m de longitud y 0,53 mm de diámetro interno. Por último aclaran que la inyección puede ser manual o automática, y que las condiciones de operación varían con el tipo de columna, del instrumento y el gas de arrastre empleados. En consecuencia deberán ser establecidas usando soluciones patrón y ajustando las condiciones para obtener una resolución óptima.

La necesidad de disminuir los niveles de cuantificación de estos compuestos y de mejorar lo anteriormente expuesto, hace indispensable implementar nuevas técnicas analíticas para hacer más práctico y amigable ambientalmente el análisis.

Para ello, se utilizó la cromatografía de gases que es la técnica analítica que ha experimentado un desarrollo más avanzado en los últimos años, y se implementó y aplicó una metodología para identificar y cuantificar los congéneres presentes en bebidas alcohólicas aprovechando su gran reproducibilidad y selectividad, las cuales son altamente confiables y con ventajas conocidas suficientemente.

Una vez determinados los parámetros para la creación del método; se procedió a establecer las concentraciones de los diecinueve congéneres para la elaboración de la curva de calibración, y se evaluó si dicho contenido afectaba o no la calidad del producto. Como una aplicación a la metodología estandarizada, se realizó un seguimiento de muestras reales de alcohol extra neutro rectificado proveniente de Ecuador debido a que posee buenas características tanto fisicoquímicas como organolépticas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar y estandarizar una técnica analítica cromatográfica (GC/FID) para la determinación de congéneres en concentraciones menores a 50 ppm, en alcohol extra neutro rectificado empleado para la preparación de bebidas alcohólicas en la Industria Licorera del Cauca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Establecer los parámetros de calidad para determinar la cantidad de congéneres en concentraciones menores a 50 ppm que presenta la técnica (GC/FID) al identificar estos tipos de sustancias presentes en las bebidas alcohólicas.

3.2.2 Utilizar herramientas estadísticas como pruebas de ANOVA (Análisis de Varianza) y SPSS para generar confiabilidad en los resultados obtenidos.

3.2.3 Modificar y mejorar el Instructivo de Control de Calidad (INCC) del método configurado para cromatografía de gases elaborado por la Ingeniera Bibiana Garcés de la Industria Licorera del Cauca.

3.2.4 Generar un POE para la determinación de congéneres en bebidas alcohólicas en el Laboratorio de Control de Calidad de la Industria Licorera del Cauca.

3.2.5 Dar una Capacitación al personal requerido, acerca de la utilización y el conocimiento general del uso del Cromatógrafo de Gases y el modo de Inyección de una muestra de alcohol en la Licorera del Cauca.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 GENERALIDADES

En la elaboración de las bebidas alcohólicas, el principal componente es el alcohol obtenido por el proceso de destilación del jugo de la caña de azúcar que ha sido fermentado previamente.

4.1.1 ETANOL, FABRICACIÓN Y TIPO DE ETANOL, FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN

Para la fabricación del alcohol, se utilizan como materia prima varias plantas enriquecidas con azúcares dependiendo del grado alcohólico que se requiera. Es importante mencionar los diferentes tipos de alcoholes que existen.

4.1.1.1 Etanol

El etanol es un líquido incoloro y volátil que está presente en diversas bebidas alcohólicas. Se obtiene de plantas ricas en azúcar (principalmente la caña de azúcar de la que se obtiene la melaza (que es un subproducto de la cristalización del azúcar) que es la principal materia prima azucarada para la producción de etanol). Desde la antigüedad se obtenía el etanol por fermentación anaeróbica de una disolución con contenido en azúcares con levadura y posterior destilación. Se hayan varias clases de alcohol de acuerdo con Espinosa y Zelaya F.⁴:

4.1.1.2 Alcohol puro o extra neutro

Es el que ha sido sometido a un proceso de rectificación, proceso posterior a la destilación; de manera que su contenido total de impurezas sea inferior a 35 mg/dm³ de alcohol anhidro y cuya destilación se ha efectuado a no menos de 96 grados alcoholimétricos.

⁴ ESPINOSA C. y ZELAYA F. Alcohol, Fabricación y Tipo de Alcohol, Fermentación y Destilación., Universidad Autónoma de Nicaragua (UNAN), León., febrero 2005., p 10-38.

4.1.1.3 Alcohol rectificado neutro

Es el sometido a un proceso de rectificación que tiene un contenido de impurezas inferior o igual a 80 mg/dm^3 en alcohol anhidro, y cuya destilación se ha efectuado a no menos de 95 grados alcoholimétricos.

4.1.1.4 Alcohol rectificado corriente

Es aquel que aun cuando se haya sometido a un proceso de rectificación tiene un contenido de impurezas entre 80 y 500 mg/dm^3 en alcohol anhidro, cuya destilación se ha efectuado a no menos de 90 grados alcoholimétricos.

4.1.1.5 Flemas

Son alcoholes que no han sido sometidos a operaciones de rectificación o purificación, o aunque lo hayan sido, tienen un contenido de impurezas superiores a 500 mg/dm^3 en alcohol anhidro. Si se obtiene a más de 70 grados se denominan de alto grado. Si se obtienen a menos de 70 grados se denominan de bajo grado.

4.1.2 Origen de otros alcoholes para licores

4.1.2.1 Alcohol vínico o destilado de vino

Es el alcohol natural obtenido por destilación de vinos sanos, holandas o aguardientes de vino, su graduación alcohólica será como mínimo de 80 grados alcoholimétricos y máximo de 96 grados alcoholimétricos.

4.1.2.2 La fermentación

Es el proceso mediante el cual se mezclan azúcares, agua y levaduras para obtener alcohol, el etanol como producto final usualmente no sobrepasa del 12 al 14 %, dependiendo del contenido de azúcar. Si se requiere un porcentaje mayor de alcohol, se somete este producto a destilación obteniendo productos que difieren en su contenido de alcohol. Otro aspecto a tomar en cuenta es la adición de congéneres, que son las sustancias que aportan color, olor, sabor característico a cada producto, el Vodka y Ginebra contienen menos congéneres que el Whisky y el Ron. Además la fabricación que interfiere con la calidad del producto final es el tipo de alambique utilizado, la fabricación artesanal le confiere mayor grado de impurezas por el tipo de alambique utilizado.

4.1.2.3 Alcohol de malta

Es el alcohol obtenido de la destilación de caldos fermentados de cebada malteada en su totalidad su graduación alcohólica será de 60 grados alcoholimétricos como mínimo y 80 grados alcoholimétricos como máximo.

4.1.2.4 Alcohol de cereales

Es el obtenido por destilación de mostos sacarificados y fermentados de cereales malteados o no, o de una mezcla de ellos, llevará la denominación del cereal de procedencia o simplemente de alcohol de cereales, si procede de la mezcla de diferentes clases de éstos. Se destilará a una graduación alcohólica entre 60 y 80 grados alcoholimétricos.

4.1.2.5 Alcohol de frutas

Es el obtenido por destilación de jugos de frutas que han sufrido previamente la fermentación alcohólica. Llevará el nombre de la fruta de procedencia o se designará simplemente alcohol de frutas si procede de la mezcla diferentes clases de éstas. Será destilado a una graduación alcohólica entre 50 y 80 grados alcoholimétricos.

4.1.2.6 Alcohol de caña

Es el obtenido por destilación especial de los jugos o melazas de caña de azúcar o sus derivados sometidos a fermentación alcohólica. La caña de azúcar se corta lo más abajo posible debido a que la espesa savia de azúcar tiende a descender por el tallo. Mientras más azúcar haya en el jugo, más alcohol se podrá producir. El jugo de la caña de azúcar se vierte del molino a tanques, pero para producir alcohol debe fermentar durante unos días. Al jugo se le puede agregar levadura, pero también fermentará con levadura natural del aire. El jugo fermentado se vierte en un tanque y se calienta sobre un fuego de bagazo. El calor hace que el jugo se evapore y este vapor pasa a través de un alambique, el cual tradicionalmente está hecho de cobre, aunque hoy en día también se fabrican con acero inoxidable. El líquido producido con el alambique se conoce como 'aguardiente' y tiene un 60% de contenido alcohólico. La graduación se mide utilizando un hidrómetro para determinar la gravedad específica.

4.1.2.7 Tafia

Alcohol de caña que no ha sido sometido a operaciones de rectificación o aunque lo haya sido tiene un contenido total de congéneres del alcohol etílico mayor de 150 mg/dm³ en alcohol anhidro y cuya destilación se efectúa entre 70 y 94 grados alcoholimétricos.

4.1.3 Destilación

La destilación se realiza para separar el alcohol del agua que pueda contener la materia prima. Se coloca la mezcla en un recipiente, se calienta a una determinada temperatura para generar los vapores del alcohol y gas. Estos vapores son condensados y recolectados en un segundo recipiente como una mezcla pura, incolora y con un delicado sabor a la materia prima pero de mayor graduación alcohólica. Este producto se puede destilar dos o mas veces para purificar el alcohol y eliminar los agentes residuales. Este alcohol luego es filtrado para liberarlo de impurezas.

4.1.4 CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA DETERMINACIÓN DE CONGÉNERES EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS

4.1.4.1 Definición de Congéneres Según el Reglamento Europeo

Según el reglamento de la Comunidad Europea (CE) número 2870/2000⁵, donde se determinan las sustancias volátiles de las bebidas alcohólicas allí se define que los congéneres son las sustancias volátiles que se forman junto con el etanol durante la fermentación, la destilación y el envejecimiento de las bebidas espirituosas.

El Reglamento de la Comunidad Europea número 1576/89⁶ fija los niveles mínimos de compuestos volátiles distintos de etanol y metanol para una serie de bebidas alcohólicas. Este contenido se considera equivalente a la suma de: ácidos volátiles expresados como concentración de ácido acético; a los aldehídos presentes en etanol, como la suma de acetaldehído y de la fracción de 1,1-dietoxietano. Los alcoholes superiores propanol, sec-butanol y alcohol isobutílico, determinados por separado; el alcohol amílico e isoamílico, determinados juntos o por separado. Los ésteres expresados como concentración de acetato de etilo; y por último el contenido de furfural.

⁵ FISCHER F., Diario Oficial de las Comunidades Europeas., Reglamento (CE) No 2870/2000 de la Comisión que establece Métodos Comunitarios de Referencia para el Análisis de Bebidas Alcohólicas; Bruselas 19 Diciembre 2000.

⁶ REGLAMENTO (CE) No 110/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, Diario Oficial de la Unión Europea 15 de Enero 2008.

4.1.4.2 Definición de Congéneres Según la Norma Técnica Colombiana

En Colombia se ha establecido la Norma Técnica Colombiana (NTC, séptima actualización 4118 de 1997) para bebidas alcohólicas, anís o anisado donde se encuentra la definición de congéneres de la siguiente manera:

Congéneres: Sustancias volátiles, naturales, diferentes de los alcoholes etílico y metílico, las cuales provienen de las materias primas empleadas o que se han originado durante el proceso de elaboración de una bebida alcohólica.

Dentro de los congéneres se consideran sustancias tales como ácidos, aldehídos, furfural, ésteres y alcoholes superiores. Para la determinación de estas sustancias se utiliza la técnica de espectrofotometría de absorción y se compara con el color producido por un patrón.

4.1.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE CONGÉNERES

4.1.5.1 Métodos Clásicos

P. Brereton, C. Guillou⁷ y otros, realizaron varios métodos clásicos para analizar bebidas alcohólicas, específicamente para determinar el grado alcohólico, extracto seco, acidez volátil, ésteres, ácido cianhídrico, anetol (anís), ácido glicérico, anfígenos y azúcares; mencionan que la mayoría de estos métodos son objeto de debate para la legislación de la Unión Europea. Para estos estudios realizaron procesos de validación en los cuales cada método fue elaborado bajo un formato y sujeto a la validación, se examinó y preparó la evaluación de los materiales y valores asignados los cuales fueron bien caracterizados porque se utilizó un protocolo de pruebas.

Los métodos utilizados para determinar el grado alcohólico fueron: la picnometría, densimetría electrónica, densimetría con balanza hidrostática e hidrometría. Aclaran que la destilación es un punto crítico en el análisis del grado alcohólico, las especificaciones y el Aseguramiento de la Calidad (QA) fueron criterios prescritos para el rendimiento en los aparatos de destilación. Por último como un estudio colaborativo utilizaron el análisis estadístico donde los resultados obtenidos demostraron que la exactitud y la precisión de todos los métodos fueron satisfactorias.

⁷ BRERETON P., KELLY J., CHAPMAN S, WITTKOWSKI R Analytical Methods for the Determination of Spirit Drinks. En Trends in Analytical Chemistry, 2003 Vol. 22, no.1, p. 19 – 25.

El método para la determinación de grado alcohólico fue publicado por la revista Oficial de las Comunidades Europeas⁸, e incluyó la etapa de destilación y estableció los niveles mínimos de compuestos volátiles excepto etanol y metanol (norma para congéneres).

Para los ésteres, que son componentes importantes en las sustancias volátiles varían dependiendo del tipo de bebida alcohólica, por ejemplo, para brandy incluye ésteres de acetato de etilo, para coñac ésteres de acetato de etilo y lactato de etilo.

4.1.5.2 Métodos Instrumentales

En la actualidad no se han realizado suficientes estudios acerca de los congéneres específicamente para bebidas alcohólicas tipo aguardiente, mientras que para el análisis de compuestos volátiles por ejemplo para whiskies, vinos, y cervezas si. Por ejemplo, las técnicas espectroscópicas se han utilizado para el análisis de congéneres en bebidas alcohólicas, en whisky para determinar su autenticidad (Mackenzie y Aylott, 2004)⁹. Una de las técnicas utilizadas es la espectrofotometría UV/Visible y compara los perfiles de absorbancia obtenidos usando los datos específicos para las marcas de whisky. Esta técnica proporciona una evaluación para determinar si se trata de un whisky escocés o no. Para evaluar la autenticidad del whisky tienen en cuenta los congéneres que se encuentran en mayor concentración como son los alcoholes superiores: 1-propanol, 2-metilpropanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol. Además la concentración de estas sustancias puede constituir la base de la diferenciación entre distintos tipos de whisky. La dificultad de la técnica radica en que si analizan una muestra de alcohol neutro, (una bebida destilada al 96.0% de etanol y prácticamente libre de congéneres), por ejemplo obtenida de la melaza de caña de azúcar puede pasar desapercibida la concentración de estos congéneres que se encuentren en cantidades pequeñas.

Otra técnica muy utilizada es la que presenta D. Lachenmeier¹⁰; donde se expone un control rápido de la calidad de las bebidas alcohólicas y de la cerveza mediante Infrarrojo utilizando Transformada de Fourier (FTIR) y los datos se analizan por medio de los Cuadrados Mínimos Parciales (SPL). Esta técnica dura menos

⁸ ibid. p. 19-25

⁹ AYLLOT G., Mackenzie D. Gas Chromatography Carbon Isotope Ratio Mass Spectrometry Applied to the Detection of Neutral Alcohol in Scotch whisky: an internal reference approach, En Food Chemistry, Mayo 2009. Vol. 114, p. 697-701

¹⁰ DIRK W. Lachenmeier; Rapid Quality Control of Spirit Drinks and Beer using Multivariate Data Analysis of Fourier transform Infrared Spectra, En Food Chemistry, 2007. Vol. 101, p. 285-832

tiempo en comparación a otras (sólo 2 minutos son necesarios para la medición por FTIR). Para las bebidas alcohólicas, no se requiere preparación de la muestra en absoluto y los espectros se pueden medir utilizando un espectrofotómetro FTIR, con diseño especial para el análisis de las bebidas alcohólicas.

El FTIR/SPL ofrece ventajas considerables si se compara con los métodos convencionales de análisis, (se pueden analizar 30 muestras por hora); proporciona un control simple y rentable de los parámetros legales, como el etanol, los congéneres volátiles y es posible además del análisis cuantitativo SPL, puede realizar una clasificación por Análisis de Componentes Principales (PCA) para el control de la autenticidad de la bebida pero solo indica qué grupos funcionales pueden estar presentes en los congéneres mas no cuál de ellos es exactamente.

M. Pontes, P. Souto¹¹ y otros, en el Instituto Adolfo Lutz de Sao Paulo, Brasil presentaron un trabajo que alertó la presencia de un número elevado de bebidas alcohólicas adulteradas, principalmente bebidas con alto valor comercial, como whiskys y también aquellas de menor valor comercial, como vodka, brandy, ron y aguardiente, la mayoría de las bebidas clandestinas son preparadas por simple dilución de las bebidas originales, por agua o etanol, o por una mezcla de alcohol, agua, caramelo y aroma. Utilizaron Infrarrojo Cercano (NIR) y métodos quimiométricos como Análisis de Componentes Principales (PCA), Modelamiento Independiente de Clases por Analogía Sencilla (SIMCA) (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*), Análisis Canónico de Grupos (HCA) (*Canonical Analysis Cluster*), Análisis por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) (*Partial Least Square Analysis*), Análisis Canónico (CA) (*Canonical Analysis*), Análisis por Discriminante (DA) (*Discriminant Analysis*).

Finalmente concluyen que, un método analítico idealmente utilizado para verificar la calidad y la autenticidad de las bebidas alcohólicas debe llevar a cabo un análisis sin hacerle tratamiento previo a la muestra; además de que la adquisición de datos sea rápida y los resultados tengan buena exactitud y con costos relativamente bajos. La combinación de métodos quimiométricos con espectroscopia NIR es una buena manera de llegar a estas premisas.

F. Kanteres y otros,¹² evaluaron la producción artesanal de alcohol en Guatemala con especial atención a la contaminación con acetaldehído. Se analizaron químicamente los componentes buenos para la salud y los contaminantes

¹¹ PONTES M., SOUTO P., Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry, En Food Research International, Marzo 2006. Vol. 39, p. 182-189

¹² FOTIS K., JURGEN R., DIRK W., Artesanal alcohol production in Mayan Guatemala: Chemical safety evaluation with special regard to acetaldehyde contamination. En Science of the Total Environment. Noviembre 2009, Vol. 407, p. 5861–5868.

incluyendo el metanol, acetaldehído, alcoholes superiores, y los metales. De estos compuestos se confirmó la presencia de acetaldehído en niveles inusualmente altos en particular en las muestras que se produjeron en la clandestinidad. La técnica utilizada fue Espectroscopia Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR); el estudio de los metales tóxicos se llevó a cabo mediante Espectrometría de Masas con Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP/MS).

4.1.5.3 Métodos Electroquímicos

Las técnicas electroquímicas son muy útiles en el análisis de las bebidas alcohólicas sobre todo cuando se desea analizar la presencia de metales en ellas. J. G. Ibañez, N. Casillas, y otros¹³, hicieron una revisión sobre las diferentes fuentes, los efectos, y las concentraciones en bebidas alcohólicas de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Ni, K, Na, y Zn. Estos metales suelen estar determinados en las bebidas alcohólicas por absorción atómica o por técnicas de emisión. Sin embargo, el alto costo de los instrumentos y la larga duración de los tiempos de preparación de la muestra que se requieren impiden su amplio uso. Los métodos potenciométricos representan una opción valiosa para tales análisis. Se revisaron las diversas fuentes y las concentraciones de los metales ya mencionados en las bebidas alcohólicas y sus efectos, los métodos de eliminación a través de los estudios electroquímicos. Por ejemplo, el contenido de Ca, Mg, y Na en el aguardiente depende de la calidad del agua utilizada para la dilución después de la destilación. En la parte de embotellamiento se utilizan cápsulas metálicas en los sellos de las botellas de las bebidas alcohólicas donde puede haber presencia de metales.

I. Rodushkin, F. Odman, y P. Appelblad¹⁴; enuncian en su artículo la evaluación del análisis inorgánico de las bebidas alcohólicas utilizando Espectrometría de Masas por Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP/MS). Esta técnica se utiliza especialmente para determinar elementos de baja abundancia tales como elementos actínidos, entre otros; en estos tipos de muestras, y se encontró que para la mayoría de los elementos con concentraciones ultra traza la precisión de la medida de la razón del isótopo cargado es superior al que se obtiene con

¹³ IBAÑEZ J., CASILLAS N., Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. En Journal of Food Composition and Analysis 2008. Vol. 21 p. 672– 683

¹⁴ RODUSHKIN I., ODMAN F., and APPELBLAD P. K., Multielement Determination and Lead Isotope Ratio Measurement in Alcoholic Beverages by High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. En Journal of Food Composition and Analysis. Diciembre 1999. Vol.12 p. 243-257

Acoplamiento de Plasma Inductivo y Sistema Cuadrupolo (ICP/QMS). Algunos de estos elementos tienen un efecto químico durante la fermentación y es importante este estudio en las bebidas alcohólicas para comprobar los niveles tóxicos.

4.1.5.4 Métodos Cromatográficos

Dentro del marco de referencia para conocimiento general se han encontrado varios estudios para el whisky; entre ellos C. Rhodes, y P. Brereton¹⁵ entre otros, han realizado estudios de análisis de alcoholes por varias técnicas y específicamente se ha encontrado que la técnica más ampliamente utilizada es la Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC/MS) utilizando marcadores isotópicos (¹³C/¹²C) como método de referencia. Ellos mostraron que es posible identificar un whisky adulterado, utilizando en la muestra varios alcoholes como el etanol, 1-propanol, 2-metilpropanol y metilbutanol que también se han obtenido en diferentes cantidades durante la transformación por la fermentación, destilación y maduración del whisky. Los estudios sugieren que el método tiene la capacidad de que al adicionar alcohol neutro, se puede detectar la autenticidad del alcohol dependiendo de la fuente de cereales para el whisky y del alcohol neutro que se

trate, sin necesidad de tener una referencia a las bases de datos y sin importar si el tipo de sustancias se encuentra en cantidades mínimas.

D. González et al,¹⁶ realizaron un estudio para caracterizar y diferenciar tres tipos de whisky (Irlandés, Escocés y Bourbon) con el fin de diferenciarlos empleando el 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol como analitos químicos por GC/FID empleando fases estacionarias polares y detección por masas. Se analizaron un conjunto de 58 muestras de whiskies que contienen 12 whiskies irlandeses, 20 muestras de whisky *bourbon*^(a) (ver listado de definiciones) y 26 whiskies de malta, se determinó el contenido de congéneres empleando como técnica de extracción la microextracción en fase sólida (SPME) en *modo headspace estático*. Los resultados proporcionaron una diferenciación del whisky irlandés de los demás.

¹⁵ RHODES C., BRERETON P., Gas Chromatography Carbon Isotope Ratio Mass Spectrometry Applied to the Detection of Neutral Alcohol in Scotch Whisky: an internal reference approach. En Food Chemistry. Mayo 2009. Vol. 114 p. 697-701

¹⁶ GONZÁLES D., GONZÁLES G., Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. En Analytica Chimica. Febrero 1999. Vol. 381 p. 257-264.

D. Lachenmeier y E. Sohnius¹⁷, llevaron a cabo el estudio de uno de los congéneres, el acetaldehído, el cual es considerado como cancerígeno para los seres humanos. Por ello es importante esta investigación porque sirve para confirmar el potencial cancerígeno cuando se ingiere altas cantidades de alcohol y por lo tanto de acetaldehído. Se han recogido datos sobre el contenido de este compuesto en una gran colección de diferentes bebidas alcohólicas (más de 1500 muestras). Los datos se han evaluado estadísticamente para encontrar diferencias entre varias muestras, así como para estimar la cantidad ingerida de acetaldehído y sus posibles concentraciones en la saliva después de la ingestión y se determinó este compuesto mediante la inyección directa por cromatografía de gases (GC). Se aplicó análisis estadístico ANOVA para probar si tres o más casos tienen incluida la misma media de *Bonferoni*^(b) y luego un análisis *post hoc*^(c) para hacer comparación de medias. También, Takeshi¹⁸ y otros, informaron que la maduración del whisky prolonga la exposición del cuerpo a una dosis dada de alcohol reduciendo la cantidad de acetaldehído en la sangre, en este estudio, se encontró la fracción no volátil en whisky (utilizando HPLC) para encontrar la

concentración de acetaldehído en la sangre a través de la inhibición de la deshidrogenasa del hígado por el alcohol (ADH).

L. Giordano, D. Rotilio¹⁹ entre otros, desarrollaron métodos de análisis para determinar compuestos en *bebidas espirituosas*^(d) que fueron desarrollados por métodos analíticos, principalmente por HPLC en fase reversa y GC-FID o GC-MS; ellos describieron un método cuantitativo para la determinación de 2-furfural con una considerable precisión y sensibilidad. Establecieron un método nuevo, específico para evaluar los niveles de 2-furfural y 5-metil furfural, en muestras de *vinagres*^(e) mediante la aplicación de la SPME acoplada a GC-MS utilizando un método de marcaje isótopo (2 – furfural D₄) en la curva de calibración, evitando así el método de adiciones estándar. La SPME *modo headspace* combinada con GC-MS se aplicó con éxito a la determinación de 2-furfural y 5 - metil furfural en

¹⁷ DIRK W. and SOHNIUS E., The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: Evidence from a large chemical survey. En *Food and Chemical Toxicology*. 2008 Vol. 46 p. 2903–2911.

¹⁸ TAKESHI H., Phytophenols in whisky lower blood acetaldehyde level by depressing alcohol metabolism through inhibition of alcohol dehydrogenase 1 (class I) in mice. En *Metabolism Clinical and Experimental*. Diciembre 2008, Vol. 57, p. 1753-1759.

¹⁹ GIORDANO L., CALABRESE R., DAVOLI E., DOMENICO R.; Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry using isotope dilution. En *Journal of Chromatography*. Octubre 2003, Vol. 1017, p. 141-149.

muestras de vinagre. Esta metodología fue muy simple, rápida y mostró buena capacidad de repetición, linealidad y sensibilidad. Esto se desarrolló con el fin de evaluar las propiedades organolépticas y posibles fraudes comerciales.

O. Lasekan y W. Lasekan²⁰; realizaron un estudio acerca de varias clases de bebidas alcohólicas tradicionales producidas en Nigeria pero en este caso identificaron las aminas Biogénicas (tiramina, putrescina, cadaverina, 2-feniletilamina, histamina y triptamina) presentes en las bebidas las cuales son consumidas con fines nutritivos, ceremoniales y medicinales. Estas sustancias han sido analizadas por HPLC, muestran que los niveles encontrados de concentración en estas bebidas parece que no tienen efectos adversos en la salud humana. Se les realizó una *dansilación*^(f), dando como resultado niveles bajos de estas aminas en cada bebida alcohólica analizada.

Abdullah, H.Yehia, L. Benet²¹; generaron un procedimiento simple de *derivatización*^(g) primaria para alcoholes de cadena larga y corta determinados por

HPLC con detección UV. Los alcoholes se derivatizaron a sus ésteres 2-(4-carboxifenil)-6-metoxibenzofurano con 1- etil - 3(3 – dimetil, aminopropilo) carbodiimida e hidrocloreuro como agente deshidratante. Se utilizaron procedimientos de extracción en fase sólida y los ésteres derivatizados logrando separar los por cromatografía en fase reversa con gradiente de elución, y luego se detectaron fluorométricamente.

Debido a que por técnicas espectrofotométricas no es posible cuantificar los congéneres que se encuentran en menor cantidad, Jrends publica en la revista Analytical Chemistry la validación de un método para análisis de congéneres por GC/FID; donde incorporó varias medidas de Control de Calidad (QC) que le permite seleccionar un sistema específico (GC/FID), así como también escoger un método oficial que beneficie algún avance tecnológico en términos de columnas para GC, y permita así cuantificar una mayor cantidad de sustancias volátiles así se encuentren en cantidades pequeñas. En la validación se encontraron dos aspectos críticos para obtener la mejor resolución en este caso para el alcohol isoamílico, para el acetato de etilo y acetaldehído. Encontró que la columna CP – WAX 57 CB ^(h) se puede usar para separar todos los analitos excepto los

²⁰ LASEKAN O., y LASEKAN W. Biogenic amines in traditional alcoholic beverages produced in Nigeria. En Food Chemistry. Mayo 2000. Vol. 69 p. 267-271.

²¹ ABDULLAH I. HAJ Y. y LESLIE Z. Determination of alcohols by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after precolumn derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-6-methoxybenzofuran. En Journal of Chromatography. Febrero 1996. Vol.724. p. 107-115.

alcoholes amílicos y la CP – CARBOWAX 400⁽ⁱ⁾ para separar todos los analitos excepto el acetato de etilo y el acetaldehído. Por lo tanto se decidió acoplar estas dos columnas y así generó una óptima resolución para todos los analitos. El análisis estadístico demostró que la precisión para la gran mayoría de los analitos combinados en la matriz fue buena. Los valores de *Horrat*^(j) estuvieron por debajo de 1 en muchos casos. Solo en unos pocos casos los valores de Horrat fueron mayores a 2, es decir por encima del valor de la ecuación de *Horwits*^(k); este valor fue para el contenido de etanal total.

4.1.5.5 Otras Matrices

Calleja y E. Falque²²; analizaron el contenido de algunos compuestos volátiles por GC/MS en diferentes vinos de Mencia. Según el origen de cada vino se muestran perfiles de terpeno con contribuciones importantes de Linalol, Citronelol, α - pineno, y β -pineno. Otros compuestos importantes fueron el fenil-etanol y alcohol bencílico. Las 67 variables de análisis se presentaron a análisis de varianza, y los resultados mostraron que sólo nueve de compuestos volátiles fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

C. Ortega, y V. Ferreira²³ entre otros; instruyeron que al tratar de comprender la naturaleza química del aroma del vino exige una determinación cuantitativa de un número bastante grande de diferentes compuestos que activan el olor; los cuales fueron compuestos que estuvieron en altas concentraciones ($>1\text{mg/L}$), acetaldehído, alcoholes superiores y algunos de sus acetatos, ácidos grasos y sus ésteres son ejemplos típicos. A los compuestos presentes en pequeñas cantidades se les realizó una pre concentración y luego un análisis GC/MS, y en este grupo se encuentran los fenoles volátiles, algunas lactonas, derivados de la vainillina, compuestos con propiedades analíticas muy pobres como por ejemplo: compuestos volátiles de azufre, aldehídos, metoxi pirazinas y furanol y algunos tioles aromáticos.

M. Wang, Y. Choong²⁴ y otros, también generaron un método directo GC usando dos estándares internos para determinar de forma simultánea el etanol y metanol

²² CALLEJA A. y FALQUÉ E., Volatile composition of Mencia wines. En Food Chemistry. Food Chemistry. Mayo 2005. Vol. 90, p. 357–363

²³ ORTEGA C., LÓPEZ R., CACHO J. y FERREIRA V. En Journal of Chromatography A. Julio 2001. Vol. 923 p. 205–214

²⁴ WANG Mei-Ling, WANG Jih-Terng, y CHOONG Youk-Meng. Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic–flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. En Food Chemistry. Julio 2001. Vol. 86 p. 609–615

en bebidas alcohólicas. El metanol es un subproducto casual durante la fermentación de las bebidas, que se deriva de la degradación de las sustancias pépticas en la materia prima. La ingesta accidental de metanol puede causar dolor de cabeza, vértigo, fatiga, náuseas, vómitos, visión borrosa, ceguera irreversible y hasta la muerte. El método consistió en enriquecer la muestra con 100 mg de 2-pentanol y 50 mg de acetonitrilo, y luego inyectar directamente en una columna capilar en un GC con detección FID para el análisis cromatográfico. El análisis se caracteriza por su corta duración. Se evaluó la confiabilidad, la exactitud y la precisión del método.

R. Nascimento, W. Franco²⁵ y otros, mostraron el análisis sobre 18 aldehídos extraídos de bebidas alcohólicas provenientes de la caña de azúcar de Brasil. Los aldehídos se separaron por fase inversa en HPLC utilizando 2,4-

dinitrofenilhidrazona (DNPH) y 10 de esos aldehídos se identificaron en 75 bebidas alcohólicas y se cuantificaron por el método de patrón externo con detección UV a 356 nm. Tener un conocimiento detallado del contenido de aldehídos contribuye notablemente a mejorar el control de calidad de las bebidas alcohólicas destiladas.

Schutter, D. Delvaux²⁶ y otros; optimizaron un estudio de compuestos volátiles mediante el análisis por SPME *modo headspace*, en combinación con (GC/MS) cuyo objetivo fue crear una técnica sencilla con menor cantidad de solvente sin derivatización con el fin de analizar una amplia gama de compuestos volátiles en el mosto de cerveza. El procedimiento se optimizó seleccionando la fibra apropiada y optimizando la temperatura y tiempo de extracción. Los límites de detección fueron muy inferiores a las concentraciones reales de los volátiles.

K. Schulz, D. Lachenmeier²⁷ y otros; también evaluaron el uso de *headspace* en combinación con GC para determinar los componentes volátiles en las bebidas espirituosas. La tecnología cuenta con un sistema mejorado *modo headspace estático* que permite el enriquecimiento y la concentración de analitos en las trampas adsorbentes antes de realizar la separación por cromatografía. Se han

²⁵ NASCIMENTO R. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. En Journal of Chromatography A. Octubre 1997. Vol. 782. p. 13-23

²⁶ SCHUTTER D. Optimisation of wort volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. En Journal of Chromatography A. febrero 2008. Vol.1179. p. 75–80.

²⁷ SCHULZ K., LACHENMEIER D., Determination of volatile constituents in spirits using headspace trap technology. En Journal of Chromatography A. Marzo 2007. Vol. 1145 p. 204–209.

alcanzado los rendimientos de extracción desde 35 hasta 55 veces con el *modo headspace estático*. Se encontraron excelentes resultados de análisis en comparación con el procedimiento de referencia europeo obteniendo un $R > 0,98$; para $p < 0,0001$. Mediante el proceso, los analitos volátiles son pre-concentrados y enfocados antes de la separación por GC, por lo que es posible una inyección en modo *splitless*. La investigación mostró que el *headspace* puede ser utilizado con mucho éxito para la determinación de compuestos volátiles en las bebidas alcohólicas.

Lay-Keow²⁸, expone que a menudo el análisis de ácidos grasos y sus ésteres que contribuyen al sabor y la calidad de las bebidas alcohólicas destiladas se

caracterizan por GC o GC/MS. Generalmente este tipo de sustancias están presentes en bajas concentraciones y algunas veces es necesario acordar varias metodologías que combinen técnicas de preparación de la muestra antes de realizar el análisis cromatográfico. Para los fabricantes de estos productos les interesa este análisis para llevar a cabo el control de la calidad de dicho producto además para estudio de aroma.

W. Wardencki, P. Sowin, J. Curyl²⁹, desarrollaron un método para determinar compuestos carbonilo, en bebidas alcohólicas (vodka) usando pentafluorobenzoximación seguida de SPME modo *headspace*, y finalmente un análisis por GC con Detector de Captura de electrones. Es muy importante elaborar nuevos métodos porque las determinaciones de los compuestos carbonílicos presentan problemas debido a: Bajo rango de concentraciones (desde mg/L hasta ng/L), la matriz es muy compleja por su alta reactividad especialmente en el caso de los compuestos no saturados.

J. Jurado, O. Navalón³⁰ y otros; estudiaron la composición de bebidas alcohólicas anisadas (pastis, sambuca, anís y raki), a través de SPME junto a GC/MS; y los principales compuestos encontrados fueron trans-anetol, cis-anetol y estragol ($C_{10}H_{12}O$), ($C_{15}H_{24}$)($C_{15}H_{20}$) Los compuestos determinados, fueron utilizados como descriptores químicos para diferenciar los cuatro tipos de bebidas. Se utilizaron como herramientas quimiométricas el Análisis de Componentes Principales (PCA),

²⁸ KEOW L., Analysis by gas chromatography/mass spectrometry of fatty acids and esters in alcoholic beverages and tobaccos. En Analytica Chimica. Agosto 2002. Vol. 465. p. 309–318.

²⁹ WARDENCKI A., PIOTR S. y CURY J. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. En Journal of Chromatography A. Enero 2003. Vol.984 p. 89–96.

³⁰ JURADO O. Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks by headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry and chemometrics. En Talanta. Abril 2007. Vol. 72. p. 506-511.

Análisis Discriminante Lineal (LDA) y Redes Neuronales Artificiales (ANN) para fines de caracterización. El análisis SPME junto a GC/MS obtuvo una alta sensibilidad, y buena reproducibilidad. Se eliminó el uso de disolventes orgánicos y redujo sustancialmente el tiempo de análisis.

S.Cabredo, Sáenz-Barrio³¹ entre otros; ilustraron una técnica de extracción líquido-líquido para la determinación de compuestos volátiles a partir de muestras de vino

por ultrasonido. La mayoría de los estudios recomiendan una fase de extracción previa a la determinación de compuestos volátiles en el vino. Los compuestos estudiados fueron el acetato de 3-metil-1-butilo, 3-metil-1-butanol, hexanoato de etilo, 1-pentanol, hexanol, octanoato de etilo, linalol, succinato de dietilo, α -terpinol, 2-fenil acetato de etilo, ácido hexanoico, alcohol etílico 2-fenil, ácido octanoico y ácido decanal. La extracción asistida por ultrasonido seguido de cromatografía de gases y detector de ionización de llama es un buen procedimiento para el análisis de compuestos volátiles en muestras de vino tinto.

A. Apostolopoulou, K. Akrida³² y otros; presentaron estudios para la bebida alcohólica llamada "Tsipouro" (aguardiente de orujo de oliva). En este estudio utilizaron GC/MS para la cuantificación de las principales sustancias volátiles (acetaldehído, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, alcohol amílico, lactato de etilo, 1-hexanol, furfural, y 2-fenil etanol) en muestras de fabricación casera y en forma comercial. Se sabe que algunos de los compuestos analizados son tóxicos y su toxicidad es directamente dependiente de su concentración. Para la mayoría de los compuestos estudiados; las muestras embotelladas muestran un menor contenido de compuestos volátiles que los caseros lo que indica una mejor calidad.

Otros estudios que tienen importancia en las bebidas alcohólicas están relacionados con la presencia de metales en las bebidas alcohólicas; el estudio de elementos traza específicamente del aluminio y sus compuestos. El aluminio es el metal más utilizado en la tecnología de los alimentos como en las latas, también utilizan papel de Al, y el pH ácido de una bebida alcohólica como por ejemplo el vino, hace que aumente la migración de metales de los contenedores hacia la bebida. Además, la calidad de los contenedores, el tiempo de ebullición, el uso indiscriminado de plaguicidas son factores que tienen repercusiones significativas

³¹ CABREDO S., SAENZ B., PINILLOS C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method. En Talanta. Julio 2006. Vol. 69. p. 1123-1129.

³² APOSTOLOPOULOU A., AKRIDA K., Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. En Food Control. Febreo 2005. Vol. 16. p. 157-164.

de presencia de aluminio. Cuando la concentración de aluminio se encuentra muy cerca del límite de cuantificación de las técnicas disponibles, los bajos niveles son difíciles de medir y actualmente se han creado técnicas como la Espectrofotometría de Absorción Atómica la cual es muy adecuada debido a su alta sensibilidad, precisión, selectividad y versatilidad.

F. López, M. López³³ entre otros, han realizado estudios de metales en bebidas alcohólicas como por ejemplo: sidra, aguardiente, ron, whisky, ginebra, anís y licores; ellos presentan un método fiable y rápido para la determinación de aluminio por espectrometría de absorción atómica utilizando horno de grafito en vino, cerveza y otras bebidas alcohólicas.

Moutsatsou, E. Chalarakis, G. Zarangas³⁴; señalan que en el proceso de producción y con el uso de alambiques metálicos de las bebidas de anís se encontraron varios metales como Fe, Cu, Ni, Zn, Cr y Cd; este tipo de metales pueden ser detectados en fase amorfa por horno de grafito.

J. Jurado, P. Barrera³⁵ y otros; estudiaron la determinación directa de Cobre, Plomo y Cadmio por espectrometría de absorción atómica electro - térmica en bebidas alcohólicas anisadas. Las bebidas alcohólicas anisadas provienen de la fermentación y destilación principalmente el anís estrellado cuyos procesos se elaboran en ollas hechas de una aleación de bronce - cobre y en alambiques metálicos y como consecuencia, algunos metales pesados como Cu, Pb y Cd pueden estar presente estas bebidas; por lo que son necesarias técnicas analíticas sensibles para su determinación como por ejemplo, la Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) por plasma acoplado inductivamente (ICP), espectrometría de rayos X, Voltamperometría y Cromatografía Iónica .

Por último, Los análisis por cromatografía de gases de compuestos volátiles resultan especialmente interesantes para determinar tanto el origen de la materia prima utilizada para la destilación como las condiciones en las que ésta se haya realizado. Algunas bebidas alcohólicas contienen otros componentes volátiles,

³³ LÓPEZ F. Aluminium levels in wine, beer and other alcoholic beverages consumed in Spain. En The Science of the Total Environment. Septiembre 1998. Vol. 220 p.1-9.

³⁴ MOUTSATSOU E. CHALARAKIS ZARANGAS G. Influence of raw materials and distillation equipment on the heavy metal content of waste from an alcoholic anis-type beverage. En Journal of Hazardous Materials. Enero 2003. Vol. 96 p. 53–64

³⁵ JURADO J.M. Direct determination of copper, lead and cadmium in aniseed spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry. En Analytical, Nutritional and Clinical Methods; Food Chemistry. 2007. Vol. 101 p. 1296–1304.

como los compuestos aromáticos, que son característicos de las materias primas para obtener el alcohol, del aroma de la bebida alcohólica y de las particularidades

de su preparación. Estos compuestos resultan importantes en lo que respecta a la evaluación de las prescripciones del reglamento (CE) número 1576/89. Este método es adecuado para determinar, mediante cromatografía de gases, la presencia de congéneres en bebidas alcohólicas.

Las concentraciones de los analitos se expresan en gramos por hectolitro de alcohol absoluto; antes del análisis es preciso determinar el grado alcohólico del producto. Las bebidas espirituosas que pueden analizarse con éste método incluyen whisky, brandy, ron, aguardiente de vino, aguardiente de fruta y aguardiente de orujo.

4.2 MARCO DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan los investigadores es la selección de la herramienta estadística adecuada, para la interpretación de los datos obtenidos fruto de la experimentación o del trabajo de campo y/o interpretar la información que se obtiene del método empleado. En muchas ocasiones la dificultad reside no solo en qué tipo de tratamiento estadístico aplicar y cómo interpretarlo, sino en todo el proceso matemático que implica.

4.2.1 APLICACIONES ESTADÍSTICAS

4.2.1.1 SPSS

Uno de los aspectos más importantes en cualquier tratamiento de datos es el contraste de hipótesis el cual se puede realizar con un paquete estadístico llamado SPSS³⁶. Para el contraste de hipótesis en el caso de variables cuantitativas se cuentan con dos tipos de análisis, los paramétricos, que proceden de un modelo que obliga a cumplir ciertos supuestos acerca de los parámetros y la distribución de probabilidad de la población de la que se extrajo la muestra, y los no paramétricos, que son menos restrictivos para poder ser aplicados. La estadística paramétrica es más precisa, pero las posibilidades de ser aplicada están limitadas.

³⁶ GONZÁLES G., TRATAMIENTO DE DATOS SPSS. Universidad de Vigo; p. 15-71.

Antes de utilizar las pruebas paramétricas, es indispensable comprobar ciertos requisitos (supuestos) para su aplicación:

a) Distribución Normal de las Poblaciones (Prueba de Shapiro-Wilk)

Para la comprobación de la hipótesis de normalidad se puede emplear la prueba de **Shapiro-Wilk**. Este es el primer parámetro que se debe aplicar para poder hacer un análisis de varianza ANOVA; es importante efectuarlo porque de los resultados obtenidos se puede definir si es posible trabajar con el valor promedio de los datos obtenidos o si por el contrario, no es posible y se deba utilizar otro tipo de variables. Así que para saber si los datos obtenidos tienen un comportamiento normal, se plantea lo siguiente:

La hipótesis nula H_0 : “el conjunto de datos sigue una distribución normal”. Y la **La hipótesis alternativa H_1 :** “el conjunto de datos no sigue una distribución normal”.

Considerando una muestra aleatoria que proceden de cierta distribución desconocida denotada por $F_{(x)}$. Se quiere verificar si dichos datos fueron generados por un proceso normal, mediante las hipótesis estadísticas mencionadas anteriormente.

Se calcula el estadístico W^{37} definido como:

$$W = \frac{1}{(n-1)s^2} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X_{(n-i+1)} - X_i) \right]^2 \quad (1)$$

Donde s^2 es la varianza muestral. Finalmente si el valor del estadístico es mayor que su valor crítico al nivel α seleccionado se rechaza la normalidad de los datos. Pero si (teniendo en cuenta el número de muestras y la tabla de valores críticos ya tabulados), el W calculado es menor que el $W_{(1-\alpha)}$ tabulado se acepta que los datos proceden de una distribución normal con un nivel de significancia mayor de 0,05.

b) Igualdad de Varianzas (Estadístico de Levene)

Uno de los supuestos que más se requieren en aplicaciones estadísticas populares, tales como el análisis de varianza, el análisis de regresión, etc., es el de la homogeneidad de varianzas. Este supuesto es crucial para garantizar la calidad de los procedimientos estadísticos utilizados tanto en pruebas de hipótesis como en la construcción de intervalos de confianza. Una vez determinada la

³⁷ GUTIERREZ H., SALAZAR R. Análisis y Diseño de Experimentos. México. Mc Graw – Hill 2004. p.103-105. ISBN 970-10-4017.

comprobación de la normalidad de los datos, se debe determinar si las varianzas en tales muestras son iguales (es decir, si se cumple la condición de homogeneidad de varianzas u homoscedasticidad), ya que de que se cumpla o no esta condición dependerá la formulación que empleemos en el contraste de medias. Existen varias pruebas que permiten comprobar la igualdad de varianzas (F de Fisher, F_{\max} de Hartley, prueba de Bartlett), pero aquí desarrollaremos la prueba de Levene que es la que emplea SPSS. Para su cálculo se realiza la comprobación de Igualdad de Varianzas definiendo el estadístico de prueba de **Levene**³⁸ como se muestra en la ecuación 2.

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Z}_i - \bar{Z})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Z_{ij} - \bar{Z})^2} \quad (2)$$

Donde Z_{ij} puede tener las siguientes definiciones:

1. $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$ donde X_i es la media del i – ésimo subgrupo.
2. $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$ donde X_i es la mediana del i – ésimo subgrupo
3. $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}'_i|$ donde X_i es la media recortada de los Z_{ij}

Al realizar el cálculo de W y si el valor calculado da mayor que el valor tabulado, para un valor crítico superior de la distribución F con $k - 1$ grados de libertad en el numerador y $N - k$ Grados de Libertad en el denominador a un nivel de significancia α , la hipótesis nula se rechaza.

Notación:

k = Número de muestras

n_i = Tamaño de la i èsima

S_i^2 = Varianza estimada para la i èsima población a partir de una muestra de tamaño n_i .

$N = n_1 + n_2 + \dots + n_k$

S^2 = Varianza total estimada

4.2.1.2 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Luego de comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las muestras, se intenta buscar el mejor ajuste entre dos variables para poder representar los datos y evaluar qué tipo de relación existe entre la variable dependiente y la variable independiente. Para ello debe recurrirse a técnicas de

³⁸ CORREA J., ROJAS L. Estudio de Potencia de Pruebas de Homogeneidad de Varianza. Revista Colombiana de Estadística. Junio 2006 Volumen 29. p. 57-76.

correlación y/o regresión, aunque también es posible transformar una de ellas en una variable categórica u ordinal y luego aplicar un ANOVA. La **correlación** es una técnica matemática que evalúa la asociación o relación entre dos variables cuantitativas, tanto en términos de direccionalidad como de fuerza o intensidad, proporcionando un coeficiente de correlación (r de Pearson). La **regresión lineal simple**³⁹ es un modelo matemático que explora la dependencia entre dos variables cuantitativas (supone que en el modelo una es la variable dependiente y otra la independiente), tratando de verificar si la citada relación es lineal y aportando unos coeficientes (a y b) que sirven para construir la ecuación de la recta de predicción.

Ambas técnicas, basadas en la media y en la varianza de las variables evaluadas, tienen importantes condiciones de aplicación, entre las que destacan la independencia de las observaciones y la normalidad, disponiéndose de alternativas no paramétricas (como el coeficiente ρ de Spearman) para la correlación cuando estas no se cumplen.

La **correlación**⁴⁰ evalúa la fuerza de asociación entre las variables, de forma similar indicando además la dirección de esta asociación, de forma que podemos saber si cuando aumenta el valor de una de ellas aumenta también el valor de la otra variable (relación directa) o por el contrario disminuye (relación indirecta).

El coeficiente de correlación r de Pearson⁴¹, cuyo cálculo es “**paramétrico**”, se basa en la media y la varianza, y asume varios supuestos:

a) Que las variables analizadas son simétricas (no hay una dependiente y otra independiente) y, por tanto, son intercambiables mutuamente.

b) Que lo que mide es el grado de ajuste de los puntos o pares de valores a una hipotética línea recta (explora la relación lineal). Esto quiere decir que podría existir otro tipo de asociación (curvilínea, exponencial, etc.) y no ser detectada por este coeficiente.

c) Que las variables se distribuyen normalmente (criterio de normalidad) en la población de la que proviene la muestra.

³⁹ AGUAYO C. M. y LORA M. E. Cómo realizar “paso a paso” un contraste de hipótesis con SPSS para Windows: (III) Relación o asociación y análisis de la dependencia (o no) entre dos variables cuantitativas. Correlación y regresión lineal simple. DOCUWEB FABIS. p. 1-15.

⁴⁰ *ibid.* p. 1- 15.

⁴¹ *ibid.* p. 1- 15.

d) Que las variables exploradas provienen de observaciones independientes (esto es, solo debe haber un valor para cada variable en cada individuo de la muestra), para evitar lo que se conoce como autocorrelación.

El coeficiente de correlación (sea o no *paramétrico*) es un valor adimensional que oscila entre -1 y +1. El valor cero se da cuando no existe ninguna correlación entre las variables analizadas; el valor -1 implica una correlación perfecta de carácter inverso (o indirecto) y el valor +1 una correlación perfecta de tipo directo (cuando una crece también lo hace la otra).

En términos generales diremos que: Si $|r| < 0,3$, la asociación es débil;
si $0,30 \leq |r| \leq 0,70$ la asociación es moderada;
si $|r| > 0,70$ la asociación es fuerte.

Por tanto, a la hora de interpretar adecuadamente un coeficiente de correlación se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. Su signo
2. Su magnitud
3. Su significación estadística
4. Sus intervalos de confianza

Por consenso, la variable dependiente o efecto ocupa el lugar de la Y en el eje cartesiano (ordenada) y la variable independiente el lugar de la X (abscisa). El modelo de regresión lineal simple intenta ajustar, con los datos de la muestra, la ecuación 3:

$$Y = a + bX + e \quad (3)$$

Donde **a** es el valor de la ordenada en el origen, esto es, el valor que adoptará Y (la variable dependiente) cuando X valga cero; **b** es conocido vulgarmente como “pendiente de la recta” y se interpreta como el cambio de Y por cada unidad de cambio de X; y **e** es el error o residual, y representa una cuantificación del desajuste de los datos de la muestra al modelo lineal, lógicamente variable de un individuo a otro, puesto que corresponde a la cantidad que habría que sumar o restar a la predicción para que coincida exactamente con lo observado. El análisis de regresión lineal empieza siempre por un **ANOVA**⁴², que trata de responder a la siguiente pregunta: ¿es mejor usar X para predecir la variabilidad de Y, o por el contrario se puede conseguir la misma explicación de Y sin tener en cuenta los valores de X, simplemente usando el valor más representativo de Y, esto es, su media? Si fuese esto último, la recta del modelo tendría pendiente cero, por lo que la hipótesis nula del contraste es precisamente:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

⁴² Op. cit. p.150-154.

y la hipótesis alternativa sería:

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Para encontrar el estadístico de prueba para esta hipótesis, es fácil ver que β_1 sigue una distribución normal.

Se rechaza la H_0 si el valor del estadístico es mayor que el valor crítico de las tablas, es decir, se rechaza H_0 si $|t_0| > t_{(\alpha/2, n-2)}$. Cuando esto ocurre, (rechazo de H_0 contraste estadísticamente significativo), se concluye diciendo que hay regresión lineal de Y sobre X , ya que se puede explicar una parte de los valores de la variable dependiente (Y) a partir de los valores de la variable independiente o predictora (X), o lo que es lo mismo, que conocido el valor x para un individuo se predice el valor de y mejor con la ecuación de la recta que con el valor medio de Y . En el caso de no rechazar $H_0: \beta_0 = 0$ para el caso del modelo de regresión lineal simple implica que no existe una relación lineal significativa entre X y Y o la relación es de otro tipo.

Si se utiliza como criterio de rechazo la comparación de la significancia observada (p -value) contra la significancia predefinida α , entonces se rechaza la H_0 si p -value $< \alpha$, donde en este caso p -value es el área bajo la curva, fuera del intervalo $[-t_0, t_0]$ de la función de densidad de distribución t - Student con $n-2$ grados de libertad. Es decir si $t_0 > 0$ p -value = $\Pr(T < -t_0) + \Pr(T > t_0)$.

Análisis de varianza del modelo de regresión

Otro enfoque para analizar la significancia del modelo es descomponer la variabilidad observada, y a partir de ello probar la hipótesis. Efectivamente la variabilidad total observada en la variable de respuesta puede ser medida a través de S_{yy} que está dada por la siguiente ecuación:

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4)$$

El primer componente de S_{yy} , se denota por

$$SC_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (5)$$

Y mide la variabilidad explicada por la recta de regresión, y se le conoce como la *suma de cuadrado de regresión*.

El segundo componente de S_{yy} , se denota por

$$SC_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (6)$$

Y mide la variabilidad no explicada por la recta de regresión y se le conoce como la *suma de cuadrado de error*.

De esta manera, la ecuación toma la siguiente forma:

$$S_{yy} = SC_R + SC_E \quad (7)$$

A partir de esta ecuación podemos ver los grados de libertad para estas sumas de cuadrados: S_{yy} tiene $n-1$ grados de libertad, SC_R tiene 1 grado de libertad, mientras que SC_E tiene $n-2$. Por tanto al dividir las sumas de cuadrados entre sus grados de libertad obtenemos los cuadrados medios:

$$CM_E = SC_E / (n-2) \text{ y } CM_R = SM_R / 1. \quad (8)$$

Todo lo anterior podemos utilizarlo para generar otra forma de probar la hipótesis sobre la significancia de la regresión:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

ya que si H_0 es verdadera, entonces el siguiente estadístico

$$F_0 = \frac{SC_R/1}{SC_E/(n-2)} = \frac{CM_R}{CM_E} \quad (9)$$

Tiene una distribución F con 1 y $n - 2$ grados de libertad en el numerador y denominador respectivamente. Por tanto, se rechaza $H_0: \beta_0 = 0$, si el estadístico de prueba es mayor que el valor crítico correspondiente, es decir, se rechaza H_0 si $F_0 > F_{(\alpha, 1, n-2)}$.

Esta forma de probar la significancia de la regresión, en el caso de la regresión lineal simple, es equivalente a la establecida a través del estadístico $t - Student$, ya que elevando su ecuación correspondiente al cuadrado, obtenemos:

$$t_0 = \frac{\widehat{\beta}_1}{\sqrt{CM_E/S_{xx}}} \quad (10)$$

$$t_0^2 = \frac{\widehat{\beta}_1^2 S_{xx}}{CM_E} = \frac{\widehat{\beta}_1 S_{xy}}{CM_E} = \frac{CM_R}{CM_E} = F_0 \quad (11)$$

Esto se debe a que en general, el cuadrado de una variable aleatoria $t - Student$ con k grados de libertad, tiene una distribución $F_{(1, k)}$.

Cuando los valores p dan menores a 0,05, entonces se debe rechazar las hipótesis nulas para ambos parámetros (intercepto y pendiente), por lo que se concluye que tanto β_0 como β_1 son significativamente diferentes de cero. Esto también se podría ver a través del método del valor crítico, ya que trabajando con un nivel de significancia de 0,05, y como se trabaja con una hipótesis de dos colas, entonces de acuerdo a las tablas del apéndice el valor crítico para cada parámetro a evaluado debe ser menor que el valor de los estadísticos encontrados. De aquí que se llegue a la misma decisión que por el método del valor p ó p - *value*.

Sin embargo la predicción que realiza el modelo de regresión lineal no es perfecta y siempre queda algo sin explicar. Este “algo sin explicar” es la **varianza residual**⁴³ que aparece en la tabla del ANOVA.

Otra forma de cuantificar el ajuste del modelo lineal a los datos es a través del llamado **Coefficiente de Determinación**⁴⁴, R^2 , que compara lo explicado por la regresión con la variabilidad total de Y , y se interpreta como el porcentaje de la variabilidad total de la variable dependiente Y que es explicada por la variable independiente X .

$$R^2 = \frac{\text{Variabilidad explicada por el modelo}}{\text{Variabilidad total}} \quad (12)$$

Es claro que $0 < R^2 \leq 1$.

También está el **coeficiente de determinación ajustado (o corregido)**, R^2_{aj} que se calcula como sigue:

$$R^2_{aj} = \frac{CM_{Total} - CM_E}{CM_{Total}} \quad (13)$$

Donde el cuadrado medio total, CM_{Total} , se obtiene al dividir la suma de cuadrados total, S_{yy} , entre sus grados de libertad. Cuando hay muchos términos en un modelo el estadístico R^2_{aj} se prefiere en lugar de R^2 , puesto que este último es engañoso al incrementarse en forma artificial con cada término que se agrega al modelo, aunque sea un término que no contribuya en nada a la explicación de la respuesta. En cambio el R^2_{aj} incluso baja de valor cuando el término que se agrega no aporta nada. Se cumple que $0 < R^2_{aj} \leq R^2 \leq 1,0$. En general para fines de predicción se recomienda un coeficiente de determinación ajustado de al menos 0,7.

⁴³ Op. cit., p.153.

⁴⁴ Op. cit., p.154.

Por último, el análisis de regresión lineal concluye calculando los **coeficientes de regresión a y b** de la recta, mediante el método de ajuste conocido por “mínimos cuadrados”. Los programas estadísticos aportan para cada uno de ellos la estimación puntual, el error estándar, la significación estadística del contraste y los intervalos de confianza, teniendo sentido interpretar las salidas del coeficiente b para tomar decisiones de que hasta qué punto y en qué magnitud la variación de Y depende linealmente de X .

Cuando se aplica el tratamiento estadístico SPSS a los datos obtenidos, y para una ecuación lineal, el programa muestra un cuadro denominado Resumen de Modelo, donde presenta el valor del coeficiente de correlación con su desviación típica, el parámetro estadístico F como se muestra a continuación:

Coeficiente de Correlación de Pearson

Compuesto	Acetaldehído
Correlación de Pearson	1,000
N	9,000

N: número de muestras

El segundo recuadro es un resumen del modelo de Regresión Lineal, con el Coeficiente de Regresión (R), el Coeficiente de Determinación (R^2), y el coeficiente de determinación corregido (R^2_{aj}).

Resumen de Modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
1	0,998	0,995	0,995

A continuación aparece un contraste de hipótesis ANOVA para la regresión, que separa la variabilidad explicada por la Regresión y la variabilidad no explicada o Residual, y calcula un estadístico F y una significación estadística.

		suma de cuadrados	gl	media cuadrática	F
modelo	regresión	34954018,11	1	34954018,11	2980,51
1	residual	82092,693	7	11727,528	
	total	35036110,8	8		

gl: grados de libertad

Esta es una primera aproximación inferencial al modelo de Regresión Lineal, que evalúa globalmente el modelo. En nuestro ejemplo es estadísticamente significativo ($p < 0,001$) y concluye rechazando la hipótesis nula y aceptando la H_1 (existe asociación entre las dos variables mediante una regresión lineal).

La segunda aproximación inferencial se muestra en el siguiente cuadro, donde se ofrecen los coeficientes del modelo:

- La constante (**a**) o valor de la ordenada en el origen (en nuestro ejemplo vale 161,6)
- El coeficiente de regresión (**b**) o pendiente de la recta (en nuestro caso vale 127,6)

Y, en las últimas columnas, el contraste de hipótesis para el coeficiente de regresión, a través de una *t* - *Student* (contraste de Wald), que parte de una H_0 que supone que el coeficiente de regresión lineal vale cero (en nuestro caso la *t* de Student vale 54,59 y el valor *p* asociado es $< 0,001$). El contraste de hipótesis para la constante no tiene sentido aplicarlo.

Con estos resultados se concluye:

1. Las dos variables están asociadas o relacionadas linealmente en la población de la que proviene la muestra.
2. La relación encontrada es fuerte ($r = 0,998$). De hecho la concentración de acetaldehído explica el 99.5 % ($R^2 = 0,995$) de la variabilidad del área.
3. La relación es directa, por cada aumento en la concentración, aumenta el área. De hecho, con estos coeficientes se puede construir la recta de regresión lineal $Y = a + bX$ que relacionaría el área con la concentración.

Una vez comprobados los supuestos de distribución normal y homogeneidad, se pueden aplicar las pruebas paramétricas. La prueba paramétrica más usada para verificar si dos o más medias muestrales proceden de la misma población es el Análisis de Varianza Anova (ANOVA). Las técnicas englobadas bajo la denominación de análisis de la varianza o abreviadamente ANOVA (del inglés Analysis of Variance) han jugado un papel crucial en la metodología estadística moderna, desde que fueran ideadas por R.A. Fisher en 1925, y como sucede en tantas ocasiones, aunque conocidas por la gran mayoría, quizás no son adecuadamente comprendidas por los no especialistas. Para la aplicación de un ANOVA es necesario cumplir los siguientes supuestos:

1. Las muestras son aleatorias
2. Las muestras son independientes
3. La distribución de la población de fueron extraídas es Normal
4. Sus varianzas son iguales

Casi siempre se introduce el tema del análisis de la varianza como respuesta a la necesidad de utilizar una técnica de comparación de más de dos grupos, es decir como un método para comparar más de dos tratamientos: si disponemos de medidas cuantitativas continuas, que se puede suponer como procedentes de una distribución de probabilidad normal, y queremos comparar dos grupos -dos tratamientos-, la prueba estadística que se utiliza es un contraste de medias

basado en la t de Student, y cuando se dispone de más de dos grupos, la prueba a emplear es el análisis de la varianza.

4.2.1.3 PAQUETE ESTADÍSTICO EXCEL

4.2.1.4 Estadístico t

4.2.1.5 Comparación de dos medias experimentales⁴⁵

Los resultados de un método analítico nuevo se pueden contrastar mediante comparación con los obtenidos utilizando un segundo método. Si se tienen dos medias muestrales \bar{X}_1 y \bar{X}_2 Tomando como hipótesis nula que los dos métodos proporcionen el mismo resultado, es decir $H_0: \mu_1 = \mu_2$ se necesita probar si ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$) difiere significativamente de cero. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar s a partir de las dos desviaciones estándar individuales S_1 y S_2 .

Para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales, \bar{X}_1 y \bar{X}_2 es significativa, es decir, para contrastar la hipótesis nula, $H_0: \mu_1 = \mu_2$ se calcula el estadístico t

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (14)$$

Donde s se calcula a partir de

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (15)$$

Y t tiene $n_1 + n_2 - 1$ grados de libertad.

Este método supone que las muestras se extraen de poblaciones con desviaciones estándar iguales.

Cuando sea poco probable que las desviaciones estándar de las poblaciones sean iguales, no es muy apropiado mezclar las desviaciones estándar muestrales para dar una estimación global o conjunto de la desviación estándar. Un método aproximado en estas circunstancias se propone a continuación:

⁴⁵ MILLER J. y MILLER J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Comparación de dos medias experimentales. 4ª edición. España. Prentice Hall. 2000. p. 45 – 47.

Para contrastar $H_0: \mu_1 = \mu_2$ cuando no puede suponerse que las dos muestras proceden de poblaciones con desviaciones estándar iguales, se calcula el estadístico t donde:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (16)$$

$$\text{con grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)} \quad (17)$$

Redondeándose el valor obtenido a un número entero.

4.2.1.6 Estadístico F

4.2.1.7 El contraste F para la comparación de desviaciones estándar⁴⁶

En muchos casos es también importante comparar las desviaciones estándar, es decir, los errores aleatorios de dos conjuntos de datos. Esta comparación, como en el caso de los contrastes de medias, puede tomar dos formas. Se puede pretender probar si el método A es más preciso que el método B difiere en su precisión (es decir un contraste de una cola) o si los métodos A y B difieren en su precisión (es decir un contraste de dos colas). Por ejemplo, si quisiéramos contrastar si dos desviaciones estándar difieren significativamente sería adecuado un contraste de dos colas.

El contraste F considera la razón de las dos varianzas muestrales, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar s_1^2/s_2^2 .

En el planteamiento más simple de análisis de la varianza se tiene una variable numérica cuantitativa (resultado), y se quiere determinar en qué medida se puede atribuir la variabilidad de ésta a otra variable cualitativa nominal que se denomina **factor**.

Por tanto se está hablando de análisis de la varianza para un solo factor, que puede tener 2 o más categorías o niveles. Cuando se intenta buscar el mejor ajuste entre dos variables, es representar los datos porque es necesario ver el tipo de relación que existe entre dos variables.

⁴⁶ Op. cit., p.53-55.

4.3 MARCO DE REFERENCIA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

Para cumplir con los requerimientos anteriores es necesario planear las actividades que se requieren para obtener métodos y datos confiables. Entre ellas tenemos:

4.3.1 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso, que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz del analito y la cantidad de parámetros de estandarización, incluye los parámetros fundamentales para que un método analítico una vez montado, pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza.

Mediante la estandarización se obtienen en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico; estos parámetros son: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad y porcentaje de recuperación. A continuación se presentan las definiciones de los parámetros a tener en cuenta en el proceso de estandarización ⁽¹²⁾.

4.3.1.1 Intervalo lineal

El intervalo lineal de un método analítico va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar medidas cuantitativas (límite de detección) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad) y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación por interpolación en una curva de calibración ⁽²⁴⁾.

4.3.1.2 Sensibilidad

La sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. ⁽²⁴⁾

4.3.1.3 Límite de detección

Es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y en un nivel de confianza dado. Se expresa en unidades de concentración ⁽²⁴⁾.

4.3.1.4 Límite de cuantificación

Es la menor concentración de analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración ²⁴.

4.3.1.5 Precisión

Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra ó patrón, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas; usualmente se expresa en términos de desviación estándar (s). Se evalúa a tres niveles: precisión intermedia, repetibilidad y reproducibilidad, los cuales se describen a continuación:

4.3.1.6 Precisión Intermedia

Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos de tiempo diferentes (mínimo cuatro días diferentes) por el mismo analista y sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

4.3.1.7 Repetibilidad

Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo (mismo día), por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

4.3.1.8 Reproducibilidad

Expresa la precisión entre resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo método por diferentes operadores y usando diferentes equipos, sobre réplicas de porciones analíticas.

5. METODOLOGÍA

Antes de mencionar como se realizó la metodología, se presentan algunas características de los congéneres

5.1 ALGUNAS PROPIEDADES DE LOS CONGÉNERES

Los congéneres estudiados en este trabajo, aparecen nombrados de diferentes formas según la Tabla 1.

Tabla 1. Nombres de Congéneres para determinar por Cromatografía de Gases según la NTC 4118

Nombre IUPAC	Nombre Común
Etanal	Acetaldehído
Alcohol Metílico	Metanol
Alcohol Iso propílico	Isopropanol
Ester Metílico	Acetato de metilo
Isobutiraldehído	2 Metilpropanal
Alcohol n – propílico	N – propanol
Etanoato Etílico	Acetato de etilo
2 – butanol	Sec - butanol
Alcohol Isobutílico	Iso – butanol
2-Metilpropanoato de 1-metil etilo	Metil Isobutirato
Alcohol 2-butílico	N – butanol
Valeraldehído	Pentanal
Metil ter-butil éter	Sec – butil acetato
Alcohol amílico	Alcohol Isoamílico
n-Pentanol	Alcohol n -Amílico
Hexanaldehído	Hexanal
Ácido Acético-3-metil-butyl-éster	3 – Amilacetato
Furan-2-Carboxaldehido	Furfural
Heptanaldehído	Heptanal

Estos diecinueve congéneres se pueden clasificar en los siguientes grupos según la (NTC 620) como se menciona en la tabla 2.

Tabla 2. Nombres de Congéneres clasificados por familias

Alcoholes Superiores	Aldehídos	Ésteres	Alcohol
Isopropanol N – propanol Sec – butanol Iso – butanol N – butanol Alcohol Isoamílico Alcohol n – amílico	Acetaldehído 2 – Metilpropanal Pentanal Hexanal Furfural Heptanal	Acetato de metilo Acetato de Etilo Metil Isobutirato Sec Butil Acetato 3 – Amilacetato	Metanol

La Norma Técnica Colombiana (NTC 620)⁴⁷, establece la concentración permitida en ppm, de los compuestos antes mencionados que aparecen en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de Congéneres y Límite máximo permitido por la NTC 620

CONGÉNER	CONTENIDO MÁXIMO (ppm)
Metanol	50
Alcoholes superiores	5,0
Ésteres	25,0
Aldehídos	2,0
Furfural	No detectable

5.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

5.2.1 Metodología

La metodología de este trabajo se desarrolló para llevar a cabo la cuantificación de los diecinueve congéneres, por cromatografía de gases GC/FID en bebidas alcohólicas tipo aguardiente, empleando reactivos grado estándar y solvente grado analítico. En la tabla 4, se listan los equipos y reactivos empleados para las diferentes determinaciones disponibles en el laboratorio de control de calidad de la Industria Licorera del Cauca. (En el anexo 1 se presentan los certificados de

⁴⁷ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC) 620, Bebidas Alcohólicas Anís o Anisado., editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), Séptima Actualización, p 1-22.

calibración de los equipos de Cromatografía de Gases, la balanza analítica y de la transfer pipeta).

Tabla 4. Equipos y reactivos disponibles en el laboratorio

NOMBRE	MARCA
Equipo de Ultrasonido	BRANSON 1510
Balanza Analítica	OHAUS, modelo AR 2140 (200g ± 0,0001)
Alcoholímetros	20 °C, Gay Lussac N° 3553 y N°45967 clase II
Desecador	SCHOTT GL 32. T (°C), Max 200°C
Destilador	SCHOTT
Cromatógrafo de Gases	SHIMADZU GC-17 A
Auto Inyector	AOC - 20i
Horno	TERMOLYNE 62700
Micropipeta	BRAND 10-100µL
Nevera	HACEB
pH- metro	METLER TOLEDO MP 225
Plancha	SCHOTT (temperatura 25- 250°C)
Horno temperatura programable	DIES
Termómetros	BRAND
Agua destilada	-----
Alcohol Extra Neutro Rectificado	-----

En la Tabla 5 se presenta el material de vidrio y plástico disponible y utilizado

Tabla 5. Material de vidrio y plástico

NOMBRE	VOLUMEN (mL)
Balones Aforados*	10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL
Probetas	250 mL
Erlenmeyers	125 mL
Pipetas Pasteur	20
Papel absorbente	10 pliegos
Pipetas aforadas	1, 5, 10, y 25 mL
Pipetas graduadas	2, 5 y 10 mL
Recipientes de vidrio SCHOTT tapa azul	7
Baño de hielo	1
Papel aluminio	2
Auxiliar de pipetas	2

*Marca balones aforados: SCHOOT DURÁN

5.3 VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO

En el marco de control de medios de análisis según ISO IEC/17025 ([estándar](#) utilizado por los laboratorios de ensayo y calibración), se exigen el conocimiento y la documentación de la precisión y tolerancia de medición de todos estos medios antes de autorizar su empleo. Se deben controlar todos los aparatos volumétricos repetidamente a intervalos determinados; pues incluso en la exactitud de medición de aparatos volumétricos pueden producirse variaciones debido a la utilización de productos químicos agresivos o a los procedimientos y la frecuencia de la limpieza. En el anexo 2 se muestra la forma como se verificó la calibración de los 25 balones aforados los cuales se utilizaron en la preparación de las soluciones estándar. Para la calibración de los balones aforados se utilizó un protocolo de estandarización⁴⁸ certificado por la ISO 9001-14001.

5.4 VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE GASES

Se verificó que el equipo (Cromatógrafo de Gases Shimadzu 17 A con auto inyector AOC - 20i) con el que cuenta el laboratorio de Control de Calidad (que se muestra en la figura 1), funciona en las condiciones adecuadas para obtener la correcta lectura de los estándares y muestras. La calibración fue realizada por el personal de la casa comercial (Shimadzu) donde se adquirió.



Figura 1. Cromatógrafo de Gases Shimadzu 17 A con Auto inyector AOC 20i

⁴⁸ BLAUDBRAND. Aparatos volumétricos y picnómetros, con certificado de conformidad; ISO 9001-14001; Instrucciones de calibrado (SOP). Julio 2009. Disponible en http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/SOPs/SOP_BLAUBRAND_ES.pdf

5.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

A continuación se describe la preparación de las soluciones utilizadas para la elaboración de las curvas de calibración.

✓ Solución Stock de Congéneres, 100 mg/L: Se preparó adicionando en alcohol al 30% partiendo del peso de cada compuesto (congéneres) 0,001g; en la tabla 6 se muestran los pesos reales obtenidos de cada compuesto para preparar la solución Stock. Esta solución se aforó a 100 mL.

Tabla 6. Pesos de los estándares y su pureza*:

Nombres Estándares	Peso Estándares (g)	Pureza (%)	CAS
Acetaldehído	0,0106 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.7	75-07-0
Metanol	0,0011 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	67-56-1
Isopropanol	0,0013 ± 2,0x10 ⁻⁴	98.0	79-20-9
Acetato de Metilo	0,0013 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	547-63-7
2 Metil Propanal	0,0107 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.0	78-84-2
N propanol	0,0096 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	71-23-8
Acetato de etilo	0,0095 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.8	141-78-6
Sec butanol	0,0108 ± 2,0x10 ⁻⁴	98.0	78-92-2
Iso butanol	0,0104 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.0	71-36-3
Metilisobutirato	0,0102 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	123-92-2
N butanol	0,0110 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	78-92-2
Pentanal	0,0110 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.0	110-62-3
Sec butil acetato	0,0102 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.0	125-24-4
Alcohol Iso – amílico	0,0102 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	110-93-1
Alcohol n – amílico	0,0097 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	125-02-4
Hexanal	0,0103 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	66-25-1
3 Amil acetato	0,0104 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	108-21-4
Furfural	0,0105 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.5	98-01-1
Heptanal	0,0092 ± 2,0x10 ⁻⁴	99.0	11-71-7

* En la tabla 6 aparecen los nombres, los pesos, y la pureza de cada uno de los compuestos: (la marca de los compuestos estándares son provenientes de EHRENSTORFER QUALITY (EQ)).

✓ Diluciones a partir de la Solución Stock de Congéneres, 100 mg de congéneres /L solución: Se preparó diluyendo 1,25 mL; 2,5 mL; 5 mL; 6,25 mL; 7,5 mL; 8,75 mL; 10 mL; 12,5 mL de la solución Stock de Congéneres a 100 mL con alcohol al 30%.

A partir de la solución Stock de Congéneres de 100 mg/L, se prepararon los siguientes estándares en balones volumétricos clase A Brand de 25 mL y se aforaron con alcohol al 30%. Se prepararon 9 diluciones en un rango de 2 a 50 ppm lo que corresponde a 9 niveles de concentración.

5.6 PARÁMETROS DEL CROMATÓGRAFO DE GASES PARA IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO

La implementación se lleva a cabo a través de los ensayos preliminares porque se desea evaluar de forma experimental y de acuerdo con las condiciones particulares del laboratorio, los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico, además de evaluar las condiciones óptimas para el funcionamiento del equipo; como son en este caso: división de split, flujos óptimos de gases, flujos óptimos de fase móvil, temperaturas del inyector y del detector, etc.

5.6.1 Implementación del método

5.6.1.1 Optimización del Flujo de la Fase Móvil (CURVA DE GOLAY)

En el plan de trabajo se estableció la estandarización instrumental detallando las principales etapas que hacen parte de este proceso. No obstante como es de conocimiento general, el proceso de estandarización implica realizar ajustes específicos para el tipo de compuestos a analizar tales como los relacionados con la optimización del flujo de la fase móvil (*Curva de Golay*); así como otros parámetros relacionados con el funcionamiento del equipo y manipulación de los datos como son los eventos de integración entre otros que hagan falta conforme la parte experimental lo establezca.

Con respecto a la optimización del flujo, se tiene que el mejor valor se alcanza para los valores excelentes del número de platos teóricos. Para ello es necesario inyectar réplicas de los flujos a evaluar con el fin de mejorar la confiabilidad estadística de los datos.

Se realizaron inyecciones por triplicado del analito que eluye aproximadamente a la mitad del análisis por razones económicas, así que el compuesto es el alcohol isoamílico utilizado para realizar la curva de Golay cuya ecuación es la siguiente:

$$H = \frac{B}{\mu} + (C_s + C_m)\mu \quad (18)$$

Donde B es la Difusión Molecular

C_s corresponde al término Transferencia de masa en la fase estacionaria

C_m corresponde al término Transferencia de masa en la fase móvil

Para establecer el rango de flujos en la columna se tuvo en cuenta las condiciones apropiadas a las cuales se debe trabajar de acuerdo con el proveedor; así que

según las instrucciones para la columna ATM – 624 con fase estacionaria 6% de Cianopropilfenil - 94% Metilpolisiloxano marca *Alltech*, se indica que el nivel máximo de presión corresponde a 9,0 psi y el mínimo a 5,8 psi; por lo tanto la determinación del flujo óptimo trabajó en estos rangos.

Se empezó a variar un flujo desde 5.4 mL por minuto hasta 8.0 mL por minuto para observar el comportamiento de la columna. En estos rangos se optimizó el flujo en el que la eficiencia de la columna fue también óptima. Se realizaron varias réplicas (por triplicado), de los flujos a evaluar con el fin de mejorar la confiabilidad estadística de los datos.

5.6.1.2 Optimización de la Temperatura del Horno

Después de que se estableció el flujo óptimo de la columna, se procedió a elaborar la mejor programación de temperatura para evaluar la mejor separación de cada uno de los congéneres, por lo cual se realizaron varios ensayos con el fin de obtener la programación más adecuada.

5.6.1.3 Temperatura del Inyector, Detector y Modo de Inyección

La temperatura del Inyector se determinó colocando un valor de 30°C por encima del componente más volátil, que sería el heptanal cuyo punto de ebullición es de 120°C; de modo que se asignó un valor de temperatura para el Inyector de 150°C. Se asignó un valor de temperatura para el Detector de 200°C.

El modo de Inyección con División (Split) consistió en introducir un volumen relativamente grande (0,1 a 1 µL) de muestra, que al vaporizarse y mezclarse con el gas portador (Nitrógeno) el flujo se divide en dos partes muy desiguales: la más grande irá al desecho, mientras que la menor pasa a la columna. En este caso se utilizó una relación de división de 2:10 porque el método que ya tenía preestablecido la *I.L.C.* tenía esta relación.

5.6.2 Sensibilidad

Se midió teniendo en cuenta la capacidad de discriminar pequeñas diferencias de concentración en un analito. A continuación se describen los límites de detección y cuantificación.

5.6.2.1 Límite de Detección

Para establecer el Límite de Detección (LOD) del equipo se hizo un estudio del blanco realizando 20 inyecciones con el fin de evaluar la mínima señal detectable

del equipo. Los resultados de las 20 inyecciones se resumieron en una tabla de frecuencias como aparece en la tabla 7, con el fin de evaluar cual era la altura que más se repetía y luego verificar que los datos tenían un comportamiento normal a través de una curva Gaussiana. Para encontrar el valor de la relación señal/ruido, se utilizó la siguiente ecuación⁴⁹:

$$clase = \text{valor de altura obtenida} \quad (19)$$

$$frecuencia = n^{\circ} \text{ de veces que se repite el valor de la altura} \quad (20)$$

$$promedio = \frac{clase}{\sum frecuencia} \quad (21)$$

Tabla 7. Tabla de clases y frecuencias para calcular la relación señal/ruido

Clase (altura señal)	frecuencia
1	475
2	1076
3	661
4	335
5	168
6	84
7	40
>8	58

Luego se encontró el valor mínimo de la concentración basado en la señal obtenida para el blanco para los diecinueve (19) congéneres a la cual se puede detectar asegurando que la señal generada corresponde al analito y se comparó con la curva de calibración.

Debido a que también se determinó el valor del LOD por medio de la curva de calibración, se utilizó la siguiente ecuación:

$$LOD = \frac{3 \times S \text{ intercepto}}{\text{promedio pendiente}} \quad (21)$$

Donde:

S es la desviación estándar del intercepto.

⁴⁹ NOGALES G. Agustín, Bioestadística Básica, 1ª edición, editorial Ebecedario p 19 - 23. ISBN: 8493341401

Ahora se presenta un ejemplo reemplazando en la ecuación el valor obtenido de la desviación estándar del intercepto y el valor promedio de la pendiente del Sec butanol:

$$LOD = \frac{3 * 22,63}{258,84}$$

$$LOD = 0.87 \text{ mg Sec butanol/L}$$

5.6.2.2 Límite de Cuantificación

Para calcular el Límite de Cuantificación (LOQ), se multiplicó por 10 al valor anteriormente encontrado para la relación señal/ruido. De esta manera se calculó la mínima señal cuantificable del equipo. Posteriormente se encontró el valor mínimo de la concentración para los diecinueve congéneres a la cual se puede cuantificar los congéneres.

5.6.3 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

El método empleado para el análisis cuantitativo de los congéneres fue la Curva de Calibración y para ello se prepararon una serie de soluciones estándar de concentraciones de 2, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 mg/L.

Seguidamente con las áreas registradas para cada concentración (cada una de ellas se midió 5 veces el mismo día y luego 5 veces por cada día por 4 días), se construyó la curva de calibración.

5.6.4 MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONGÉNERES

Para la estandarización del método se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

5.6.4.1 Repetibilidad

Consistió en la lectura de los estándares de congéneres, en total, se realizaron 45 ensayos continuos en un total de 46 horas, realizada el mismo día, por la misma analista, en el mismo laboratorio y en el mismo equipo. Los resultados obtenidos se reportaron como miligramos por litro de solución (mg/L).

5.6.4.2 Precisión intermedia

Se examinó como la precisión obtenida para los estándares en el rango de concentraciones de 2 a 50 mg de congéneres/L. Se evaluó la variabilidad del método efectuando varios análisis sobre la muestra en diferentes días (4 días) por la misma analista, sobre la misma muestra homogénea y usando el mismo equipo; fueron 118 ensayos para precisión intermedia. Una vez realizada la curva de calibración de los congéneres, se llevó a cabo ésta etapa con el propósito de obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio de control de calidad, los valores de los parámetros estadísticos que se usarán como criterio de confianza del método analítico.

5.6.4.3 Intervalo lineal

Para evaluar la linealidad, se preparó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones empleadas para el método de cuantificación. A las soluciones, una vez preparadas, de igual manera que en el método de cuantificación se leyeron sus áreas en el Cromatógrafo de Gases. A cada estándar de congéneres se realizaron cinco lecturas y a partir de los datos obtenidos de las áreas y sus respectivas concentraciones, se graficó la curva de calibración para establecer el intervalo lineal de este método.

5.6.4.4 Sensibilidad

Se midió teniendo en cuenta la capacidad de discriminar pequeñas diferencias de concentración en un analito.

5.6.4.5 Precisión del método

Se examinó como la precisión obtenida para una muestra de alcohol, que bajo las mismas condiciones de operación, en intervalos de tiempo diferentes, se preparó diariamente, durante 5 días y se procedió a analizar por la misma analista, sobre la misma muestra homogénea y usando el mismo equipo.

5.6.4.6 Parámetros estadísticos

Con el fin de analizar el grado de concordancia entre los datos individuales obtenidos cuando el método se aplica repetidamente a múltiples inyecciones de una muestra homogénea y la precisión intermedia, cada muestra y/o estándar se midió cinco veces, determinándose la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (% RSD). También se determinó la Varianza, y se aplicaron otros parámetros estadísticos como Los Contrastes de Significación dentro de los cuales se aplicó La Comparación de Dos Medias Experimentales tomando como hipótesis nula que las dos medias no difieren significativamente de cero. También

se utilizó El Contraste de dos Colas y el Contraste F para la Comparación de las Desviaciones Estándar.

Finalmente se aplicó para la eliminación de los datos anómalos la prueba de Grubs, un contraste recomendado por ISO.

5.6.5 Robustez del método

Para evaluar la robustez del método, se prepararon 3 soluciones estándar de diferente concentración (15 y 30 mg/L) se refrigeraron a una temperatura de 15°C porque hay varios de los analitos que se evaporan a temperatura ambiente y se realizaron inyecciones por triplicado por tres días consecutivos.

5.6.6 Análisis Estadístico

Se aplicó el paquete estadístico SPSS para evaluar la Normalidad de los datos y para saber qué tipo de pruebas se podían aplicar (paramétricas o no paramétricas).

5.6.7 Análisis de muestras reales

Para el análisis de muestras reales, se recogieron muestras provenientes de la sección de preparación donde se almacena el alcohol para la elaboración del aguardiente. Se midió el grado alcohólico y se inyectó la muestra utilizando el método ya calibrado teniendo en cuenta que este método es aplicable en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 mg/L solución. Esto se hizo una vez cada semana por tres semanas y a los dos meses de haber estandarizado el método.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Los equipos, reactivos y materiales utilizados en el laboratorio de control de calidad, cumplieron con las condiciones mínimas para poder ser utilizados en la elaboración de la estandarización del método.

6.2 VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO

De acuerdo con los resultados obtenidos en la verificación de la calibración del material de vidrio para el caso de los matraces aforados, los datos mostraron que están por debajo del límite permitido. Al hacerlo, la dispersión de los valores individuales medidos no dio mayor que un cuarto del límite de error admisible del aparato de medida correspondiente. Para un valor $< 0,01$ mL significa que la incertidumbre de trabajo debida a este material es aceptable. Teniendo en cuenta el procedimiento seguido del protocolo de estandarización, los resultados se presentan en el anexo 2.

6.3 VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE GASES

Se verificó que el equipo (Cromatógrafo de Gases Shimadzu 17 A con auto inyector AOC - 20i) con el que cuenta el Laboratorio de Control de Calidad (figura 1), funcionó en las condiciones adecuadas para obtener la correcta lectura de los estándares y muestras. La calibración fue realizada por el personal de la casa comercial (Casa Científica) donde se adquirió. En el anexo 1 aparece el informe de la calibración del equipo.

6.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

Las soluciones estándar preparadas aparecen referenciadas en la tabla 9 donde se obtuvo una solución Stock de 100 ppm; los valores reales son presentados en el anexo 3.

6.5 PARÁMETROS DEL CROMATÓGRAFO DE GASES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

6.5.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO

6.5.1.1 Optimización del flujo de la fase móvil (Curva Golay)

El estándar de alcohol isoamílico utilizado en la optimización del flujo óptimo a través de la elaboración de la *Curva de Golay*, generó varios cromatogramas donde por cada flujo se hicieron tres inyecciones. En el anexo 4 se muestran todos los cromatogramas obtenidos para el análisis del flujo óptimo.

A un flujo alto no se observa una buena separación, es decir, la separación estaría por debajo de la eficiencia esperada por la columna. A un flujo demasiado pequeño, el fenómeno de difusión longitudinal provocará el ensanchamiento de las bandas originando una pérdida de sensibilidad en el método y un aumento considerable en el tiempo de análisis. Se aplicó un flujo de fase móvil óptimo en el que la eficiencia de la columna fue también óptima.

Este flujo se determinó realizando la gráfica de *Golay*, donde se graficó la velocidad lineal (μ) contra la altura de un plato teórico (H). En una hoja electrónica⁵⁰ se realizó la tabulación de los datos, el cálculo de los resultados y la gráfica. Para ello fue necesario conocer el tiempo de retención y el ancho de banda del alcohol isoamílico para calcular el número de platos teóricos (N) y de esta manera encontrar H. Luego con cada valor de H que se encontró por cada valor de flujo, se realizó la curva y finalmente se identificó el mínimo. Para realizar la conversión del flujo volumétrico a modo lineal, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros los cuales se utilizaron para realizar la gráfica de *Golay* en función de la velocidad lineal y a través de la curva, observar la contribución individual de cada término de la ecuación de *Golay*. En las tablas 8 y 9 se enuncian las fórmulas y los términos correspondientes para el estudio.

⁵⁰ CASTILLO J., Laboratorio de Análisis Instrumental; Septiembre 2008. Disponible en http://www.google.com.co/search?hl=es&rlz=1W1ADFA_es&q=castillo+laboratorio+analisis+instrumental+septiembre+2008&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs_rfai=

Tabla 8. Fórmulas para determinación *Curva Golay*

Fórmulas
$N = (4t_R / W_b)^2$
$H = L / N$
$u = L / t_m$
$P_o = P_e / P_s$
$j = 1.5 [((P_o^2 - 1) / ((P_o^3 - 1))]$
$F_c = u \cdot \eta^2 K / T^{o*j}$

Tabla 9. Términos para determinación *Curva Golay*

t_R	Tiempo de retención del compuesto (min)
t_M	Tiempo de retención del disolvente (min)
W_b	Ancho del pico cromatográfico (min)
N	Número de platos teóricos
L	Largo columna (cm)
H	Altura de plato teórico (HETP)
u	Velocidad Lineal (cm/min)
P_e	Presión absoluta a la entrada de la columna (atm)
P_s	Presión a la salida de la columna (atm)
j	Factor de corrección por efecto del cambio de presión
T^o	Temperatura del horno (oK)
r	Radio de la columna (cm)
F_c	Flujo de fase móvil a la salida de la columna

La elaboración de la curva de Golay se hizo empleando una hoja electrónica en la cual se realizó la tabulación de los datos, el cálculo de los resultados y la gráfica a la vez. Los cálculos necesarios para calcular el flujo óptimo se presentan en la revista Laboratorio de Análisis Instrumental del Profesor Jorge Castillo⁵¹. De este modo se encontró el flujo óptimo de la columna y los cálculos necesarios para encontrar este valor se muestran en el anexo 5. Se encontró que el flujo óptimo fue de 7,2 mL/min como se muestra en la figura 2.

⁵¹ *ibid.*, p.1-4

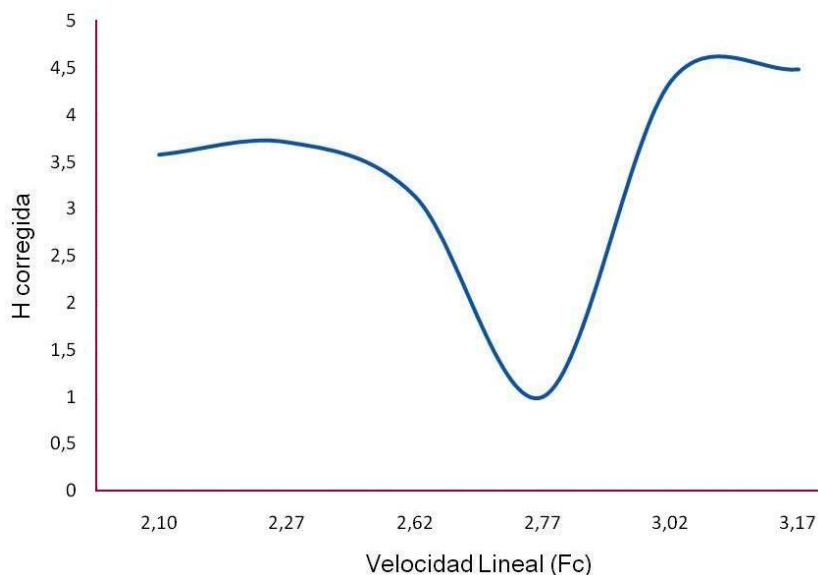


Figura 2. Resultado Experimental de la *Curva de Golay*: Velocidad lineal vs Altura de platos teóricos (corregida)

6.5.1.2 Optimización de la Temperatura del Horno

Se estableció la programación de temperatura del horno teniendo en cuenta la mejor resolución que presentaron los diecinueve congéneres. Sin embargo al realizar las inyecciones se observa que dentro de los analitos estudiados dos de ellos se solapan debido a que presentan tiempos de retención muy parecidos. Los dos congéneres que presentan solapamiento son el Isopropanol (IPA) y Acetato de Metilo (AM). Además los dos primeros compuestos que eluyen, (acetaldehído y metanol), están demasiado juntos. La programación de temperatura planteada fue: 35°C, 5 min @ 3°C/min, 100°C, 5 min @ 5°C/min, 120°C, 5 min. En la figura 3 se muestra el cromatograma donde presenta la señal para los diecinueve congéneres con esta programación:

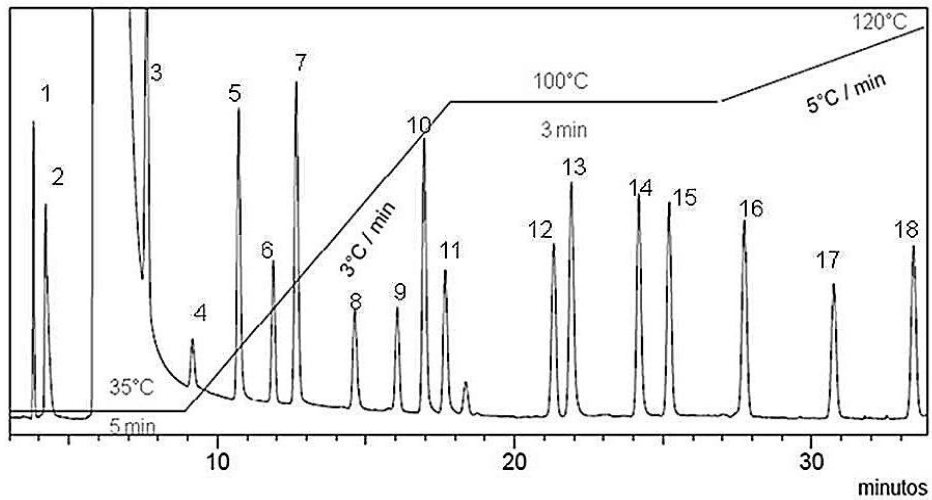


Figura 3. Cromatograma de Congéneres con Programa de Temperatura

En la tabla 10 se enuncian los congéneres por orden de elución.

Tabla 10. Congéneres por orden de elución

Congéneres	Orden de Elución
Acetaldehído	1
Metanol	2
Isopropanol	3
Acetato de Metilo	3
2 Metil Propanal	4
N propanol	5
Acetato de etilo	6
Sec butanol	7
Iso butanol	8
Metil Isobutirato	9
N butanol	10
Pentanal	11
Sec Butil acetato	12
Alcohol Iso – amílico	13
Alcohol n – amílico	14
Hexanal	15
3 Amil acetato	16
Furfural	17
Heptanal	18

Al observar el cromatograma, solo eluyen dieciocho; por el solapamiento mencionado anteriormente entre el Isopropanol y acetato de metilo (IPA y AM). Los compuestos solapados se podrían separar dejando por más tiempo la primera programación, pero según lo requerido por la *I.L.C.* necesitaba que el método durara poco tiempo de análisis. El método contenido en la *I.L.C.* tenía un tiempo de 35,45 minutos pero presentaba el solapamiento de los dos compuestos.

Debido a esto, se decidió montar un segundo método a una programación de temperatura diferente pero con una mejor separación y aprovechando este nuevo método, se decidió incluir al metanol porque salía muy seguido al acetaldehído. Sin embargo, en el primer método se podía separar el IPA y AM pero el tiempo total de análisis duraba aproximadamente 90 minutos por lo que resultaba más ventajoso crear dos métodos y el análisis total al final quedaría de 46 minutos aproximadamente y así obtener mejores resultados. Así que se asignaron dos métodos: el primer método fue diseñado para 16 compuestos quedando por orden de elución como se muestra en la tabla 10, pero debido a la alta inestabilidad del acetaldehído; se preparó una solución estándar por aparte aclarando que se pasó por el método 1; la única diferencia es que tiene curva por aparte; y el segundo método para los 3 compuestos con orden de elución como se explica en la tabla 11. Como la mejor programación de temperatura para cada método se encontró teniendo en cuenta la mejor resolución de los picos, y claramente en la Figura 4 se observa que los picos están bien resueltos; a continuación se presentan las tablas y figuras respectivas.

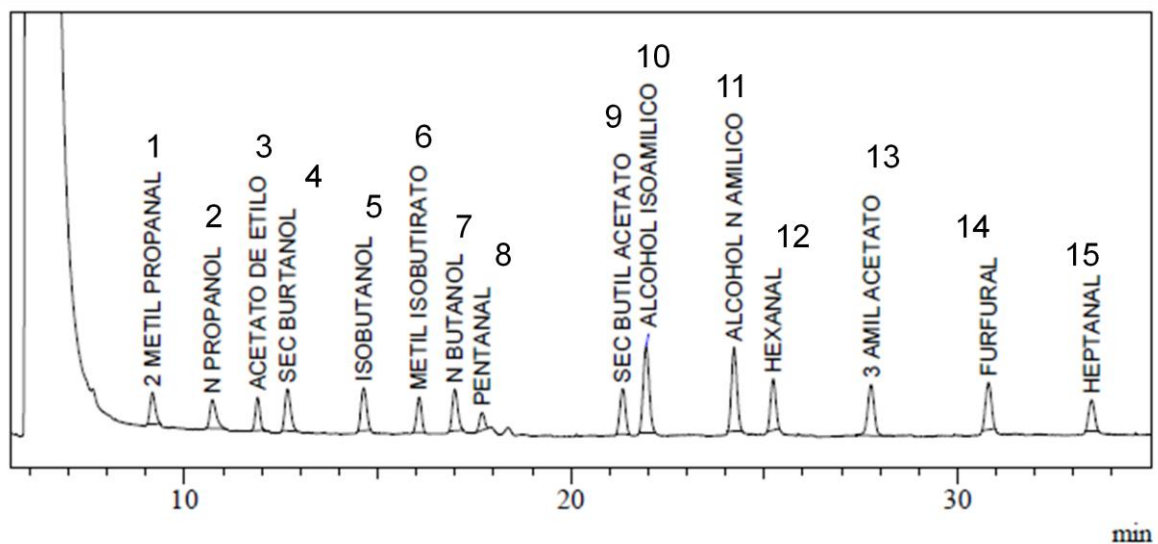


Figura 4. Cromatograma de congéneres con programación de temperatura obtenido por el método 1

Tabla 11. Congéneres por orden de elución para el método 1

congéneres	orden de elución
acetaldehído	1
2 metil Propanal	2
N propanol	3
Acetato de etilo	4
Sec butanol	5
Iso butanol	6
Metil Isobutirato	7
N butanol	8
Pentanal	9
Sec Butil acetato	10
Alcohol Iso – amílico	11
Alcohol n – amílico	12
Hexanal	13
3 Amil acetato	14
Furfural	15
Heptanal	16

En la optimización de la temperatura del horno, se tuvo en cuenta la resolución para evaluar la capacidad con la que se separaron aquellos congéneres que se encuentran a corta distancia uno del otro. Se determinó el factor de resolución el cual debe ser igual o superior a 1,5 para considerar que se ha alcanzado una resolución a línea de base, es decir, que existe una zona entre aquellos picos en que la señal coincide con la línea base del cromatograma. En la tabla 12 se muestra un ejemplo representativo para encontrar la resolución entre el Acetato de etilo y el Sec butanol.

Tabla 12. Tiempos de retención y anchos de banda, acetato etilo y Sec butanol

Acetato de etilo		Sec butanol	
t _{R1}	11,184	t _{R1}	12,654
t _{R2}	11,938	t _{R2}	12,713
t _{R3}	11,943	t _{R3}	12,718
t _{Rprom.}	11,688	t _{Rprom.}	12,695

Tabla 12. (Continuación)

Acetato de etilo		Sec butanol	
W ₂	12,111	W ₂	13,101
W ₂	12,158	W ₂	13,111
W ₂	12,148	W ₂	13,161
W _{2prom.}	12,139	W _{2prom.}	13,124
W ₁	11,671	W ₁	12,424
W ₁	11,748	W ₁	12,518
W ₁	11,754	W ₁	12,511
W _{1prom.}	11,724	W _{1prom.}	12,484

Con los valores de la tabla 12, se calculó la resolución entre el acetato de etilo y el sec butanol dando un valor de 1,9 indicando que la resolución entre estos dos picos es muy buena.

Tabla 13. Resolución obtenida para los congéneres del método 1

Congéneres	pico #	tiempo retención (tr)	Resolución (R)
2 metil Propanal	1	9,2	>1,5
N propanol	2	10,7	>1,5
Acetato de etilo	3	11,9	1,9
Sec butanol	4	12,7	1,9
Iso butanol	5	14,6	>1,5
Metil Isobutirato	6	16,1	>1,5
N butanol	7	16,9	1,5
Pentanal	8	17,5	1,5
Sec Butil acetato	9	21,4	1,0
Alcohol Iso – amílico	10	21,9	1,0
Alcohol n – amílico	11	24,2	2,1
Hexanal	12	25,3	2,1
3 Amil acetato	13	27,7	>1,5
Furfural	14	30,8	>1,5
Heptanal	15	33,4	>1,5

En la tabla 13, para aquellos compuestos con resolución igual a 1, la separación entre ellos es de un 98% y se considera aceptable. Los valores de resolución iguales o superiores a 1,5; se considera que se ha alcanzado una muy buena resolución, es decir que existe una zona entre los dos picos en la cual la señal generada coincidió con la línea base del cromatograma.

Después de realizar varios análisis, se encontró que los valores fueron los óptimos para lograr la separación de los congéneres. (ver tabla 14)

Tabla 14. Programación de Temperatura Primer Método

Velocidad(°C/min)	Temperatura (°C)	HoldTime (min)
-----	35	5
3	100	5
5	120	0

En la figura 5 se muestra la mejor separación del IPA y AM con el método 2, donde ya no existe solapamiento de los dos compuestos lo que permite su cuantificación e identificación.

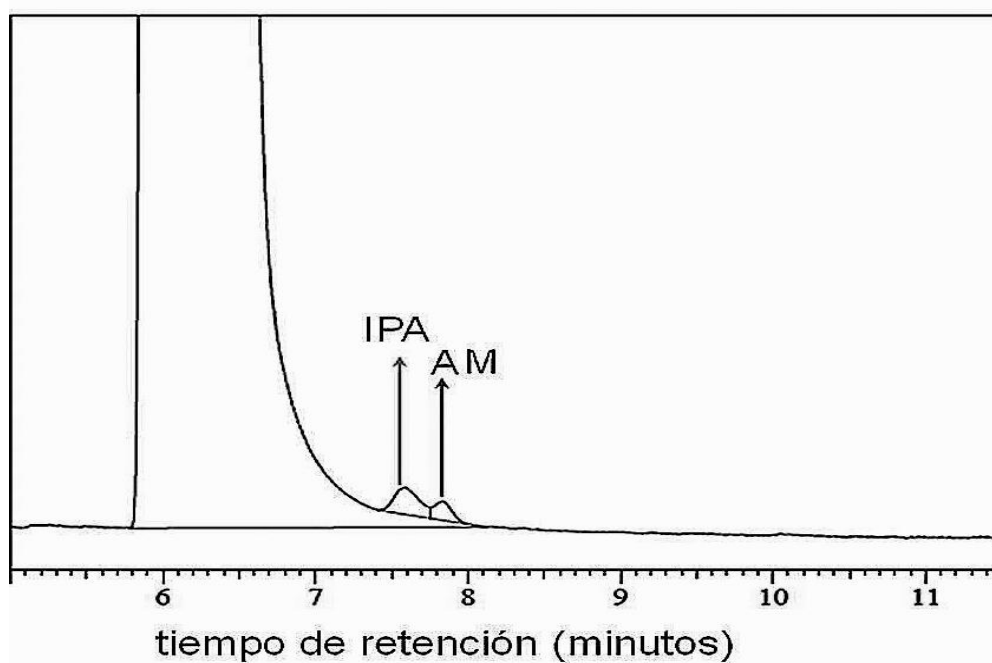


Figura 5. Cromatograma de congéneres con programación de temperatura para separar el IPA y AM obtenido por el método 2.

Luego se incluyó el metanol en el método 2 para obtener mejores resultados.

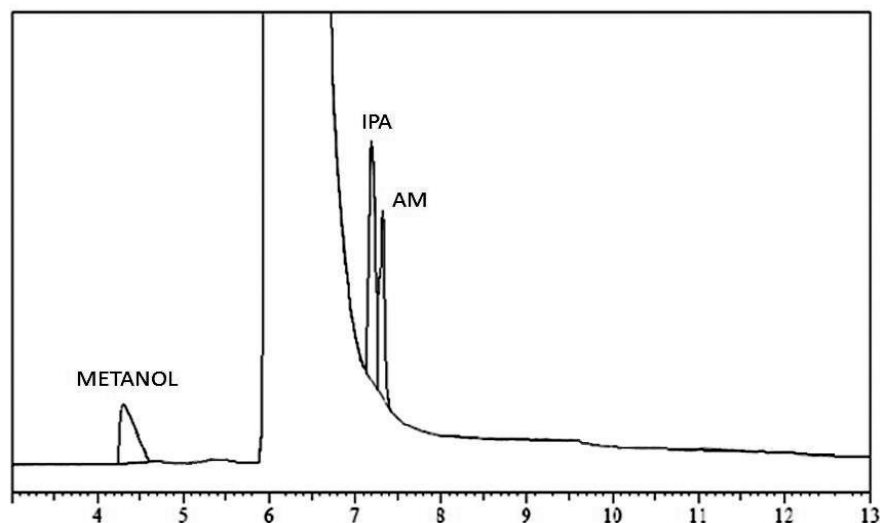


Figura 6. Cromatograma de congéneres con programación de temperatura obtenido por el método 2 con los tres compuestos

Como se observa en el cromatograma de la figura 6, el metanol no interfiere para nada en la elución del IPA y AM porque claramente se ve que eluye antes del solvente.

En la tabla 15 se indica el orden de elución de los tres compuestos.

Tabla 15. Congéneres por orden de elución para el método 2

Congéneres	Orden de elución
Metanol	1
Isopropanol (IPA)	2
Acetato de metilo (AM)	3

En la tabla 16, se encontró un valor de resolución igual a 1,2; lo que indica que la separación entre ellos es aproximadamente un 98% y se considera aceptable.

Tabla 16. Resolución obtenida para los congéneres del método 2

Pico #	Tiempo Retención (tr)	Resolución (R)
1	4,2	>1,5
2	7,2	1,2
3	7,3	1,2

En la tabla 17, se muestra como queda la programación de temperatura del método 2.

Tabla 17. Programación de Temperatura Segundo Método

Velocidad(°C/min)	Temperatura (°C)	HoldTime (min)
-----	35	6
25	150	3

Para lograr la separación del IPA y AM se encontró la mejor programación de temperatura, donde fue necesario realizar un cambio fuerte desde 35 hasta 150 °C para poder encontrar la separación de los dos compuestos. De esta manera queda optimizada la Temperatura del Horno para cada Método.

6.5.1.3 Temperaturas del inyector, detector y modo de inyección

En la tabla 18 se muestran los valores de temperaturas para el inyector, detector y el modo de inyección utilizado:

Tabla 18. Valores de temperaturas y modo de inyección utilizado

	Inyector	Detector	Modo inyección
temperatura (°C)	150	200	Split 2:10

6.5.1.4 Límite de detección

Debido a que la señal del equipo presentaba fluctuaciones en la deriva porque la línea base se iba incrementando a medida que pasaba el tiempo y porque la señal no conservaba alturas semejantes. Se decidió establecer la relación señal/ruido inyectando 20 veces el blanco y normalizando los datos; encontrando la señal promedio del ruido.

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del promedio de la frecuencia, el producto de la clase por la frecuencia y finalmente la media utilizando las ecuaciones 19, 20 y 21.

Tabla 19. Tabla de clases y frecuencias y promedio

promedio frecuencia	Frecprom. *	media
2904	8129	2,80

*Frec.prom.: frecuencia promedio

En la figura 7 se muestra el gráfico obtenido con los datos anteriores.

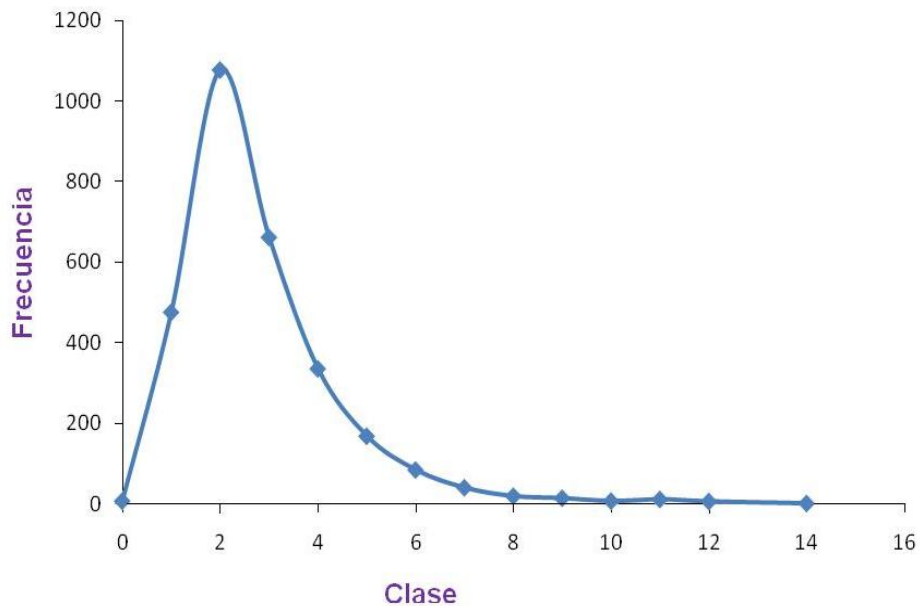


Figura 7. Curva Gaussiana para determinar LOD

Una vez comprobada la normalidad de los datos se calculó la señal del equipo como tres veces la señal del valor medio del ruido, es decir 9.

Para determinar la mínima concentración detectable para la señal del equipo de cada uno de los diecinueve congéneres, se prepararon diluciones a partir de una solución madre, y se encontraron las concentraciones a las cuales se dio esa señal. En el anexo 6 se presentan la desviación estándar y el % RSD, de las señales obtenidas para los congéneres y los resultados de las concentraciones obtenidas para LOD.

También se calculó la mínima cantidad detectable utilizando los resultados de los interceptos y las pendientes obtenidas por las ecuaciones de las curvas de calibración. Las ecuaciones de cada curva y los resultados del valor promedio de los interceptos y las pendientes se presentan en el anexo 7 para cada compuesto. En la figura 8 se presenta un ejemplo representativo del cálculo de la concentración de LOD mediante curva de calibración para Sec butanol. En la figura, aparecen 5 series indicando 5 inyecciones por cada nivel de concentración.

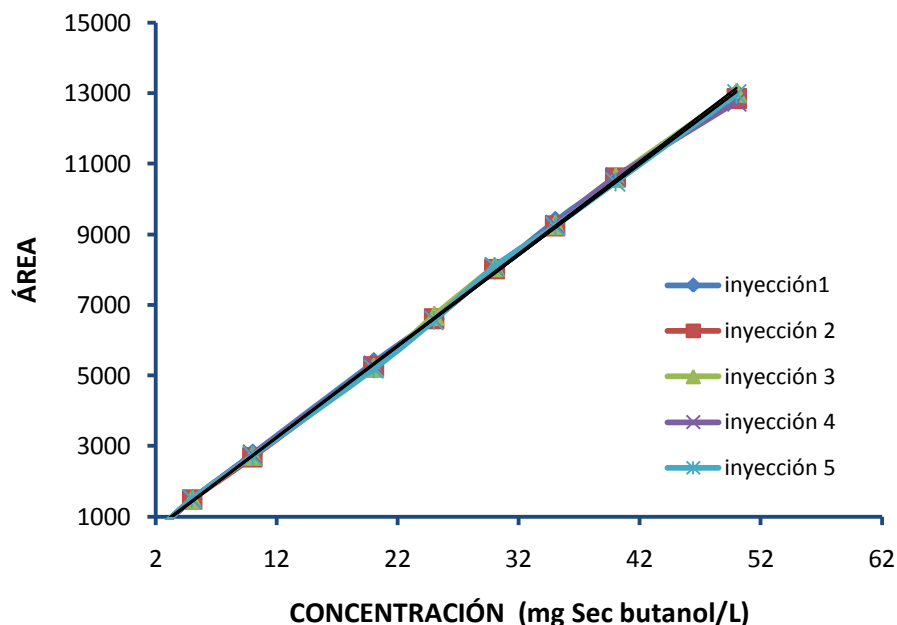


Figura 8. Curvas obtenidas para Sec butanol

En la tabla 20 se registran las ecuaciones obtenidas a partir de cada área (provenientes de las 5 inyecciones realizadas) producida por cada nivel de concentración (2 a 50 mg Secbutanol/L).

Tabla 20. Ecuaciones, media del intercepto, pendiente y desviaciones estándar

#	ecuaciones	Interceptos	Pendientes	media intercepto	145,13
1	$y = 260,58x + 127,02$	127,02	260,58	desvest. intercepto	22,64
2	$y = 258,69x + 129,36$	129,36	258,69	media pendiente	258,84
3	$y = 257,01x + 182,64$	182,64	257,01	desvest. pendiente	1,37
4	$y = 259,7x + 148,72$	148,72	259,70		
5	$y = 258,24x + 137,85$	137,85	258,24		

La ecuación pertinente para encontrar el LOD para los congéneres es mostrada en el anexo 8. En la tabla 21 se registran los valores de concentraciones obtenidos por medio de la relación señal/ruido del equipo y por medio de las curvas de calibración para los 19 congéneres:

Tabla 21. Valores obtenidos para la señal del equipo

LOD	Señal promedio de la Altura	Conc*.(ppm)	Por curva cal*.
Acetaldehído	10	<0,5	0,2
Metanol	10	0,7	0,2
IPA	9	0,6	0,4
AM	10	0,6	0,6
2 Metil Propanal	11	<0,3	0,4
N Propanol	11	<0,9	0,6
Acetato Etilo	11	<0,7	0,2
Sec Butanol	12	<0,9	0,3
Iso Butanol	11	<0,9	0,3
Metil Isobutirato	10	<0,9	0,3
N Butanol	9	0,9	0,9
Pentanal	10	<0,8	0,5
Sec Butil Acetato	11	<0,7	0,7
Alcohol Isoamílico	11	<0,9	0,3
Alcohol N Amílico	10	<0,9	0,1
Hexanal	10	<0,8	0,2
3 Amil Acetato	9	0,5	0,4
Furfural	10	<1,0	0,5
Heptanal	10	<1,0	0,4

curva cal*:curva de calibración

Conc*: concentración

El Límite de Detección obtenido estuvo en un rango de concentraciones desde 0,5 hasta 1 mg/L, calculado como la relación señal/ruido en un factor de 3. Esta es la menor concentración de sustancias volátiles que se puede detectar, mas no cuantificar en una muestra de alcohol extra neutro rectificado. Comparando estos resultados con los obtenidos a partir de la curva de calibración estuvo en un rango de concentraciones de 0,2 hasta 1 mg/L, lo que indica que la mínima cantidad cuantificable encontrada está por debajo (LOD< 1.0 ppm) de los valores de concentración mínimos permitidos que exige la NTC 620⁵² (5 ppm hasta 80 ppm).

6.5.1.5 Límite de Cuantificación

Para calcular el Límite de Cuantificación (LOQ), se multiplicó por 10 al valor anteriormente encontrado para la relación señal/ruido LOD (3.0). De esta manera se calculó la mínima señal cuantificable (30).

⁵² Icid. p. 1-12

Tabla 22. Valores obtenidos para LOQ

Compuesto	por altura		por curva cal*.
	media h	Conc.(ppm)	Conc.(ppm)
Acetaldehído	32	<2,0	0,8
Metanol	30	<1,2	0.8
IPA	31	<1,0	1,4
AM	31	<1,0	1,9
2 Metil Propanal	30	<1,8	1.5
N Propanol	33	<1,0	1,8
Acetato Etilo	29	<1,2	0,7
Sec Butanol	30	<1,2	0.9
Iso Butanol	31	<1,0	1,0
Metil Isobutirato	31	<1,5	1,0
N Butanol	31	<1,0	2,8
Pentanal	26	<1,6	1,0
Sec Butil Acetato	31	<1,5	1,8
Alcohol Isoamílico	31	<1,0	1,1
Alcohol N amílico	32	<1,2	0,3
Hexanal	31	<1,2	0,5
3 Amil Acetato	29	<1,4	1,0
Furfural	25	1,2	1.6
Heptanal	31	<1,4	1,4

*Curva cal: curva de calibración

*Conc: concentración

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 22, el límite de cuantificación obtenido estuvo en un rango de concentraciones desde 0.3 hasta 2 mg/L, calculado como la relación señal/ruido en un factor de 10. Esta es la menor concentración de sustancias volátiles que se puede cuantificar. El LOQ también se determinó a través del procedimiento sugerido por la IUPAC⁵³ utilizando los resultados de los interceptos y las pendientes obtenidas por las ecuaciones de las curvas de calibración. Los cálculos para determinar el LOQ de los congéneres se muestran en el anexo 8. Comparando los resultados de las concentraciones obtenidas por la altura; con los obtenidos a partir de la curva de calibración estuvo en un rango de concentraciones de 0,3 hasta 1,9 mg/L, lo que indica que la

⁵³ MOKA J., BOND A. M., MITCHELL S. *Pure & Appl. Chem.*, INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, No. 2, 1997 Vol. 69. Printed in Great Britain. p. 297-328.

mínima cantidad cuantificable encontrada está por debajo de los valores de la curva de calibración.

Analizando los resultados obtenidos para el límite de detección y cuantificación, se observó que la mínima concentración detectable fue baja, indicando así una buena sensibilidad al detectar y cuantificar congéneres en el rango establecido para muestras de alcoholes.

6.5.1.6 Intervalo Lineal

De acuerdo con las curvas graficadas de las concentraciones y sus respectivas áreas en el intervalo de concentraciones de 2, 5, 10, 20, 25, 30, 40 y 50 mg/L, éste intervalo, como se observa en las figuras del anexo 9; y en este intervalo de concentraciones, su coeficiente de correlación fue bueno en un rango desde 0,993 hasta 0,999 (valor analizado posteriormente, próximo a 1), comprobando la respuesta lineal del equipo en el rango de concentraciones de los congéneres trabajados.

6.5.1.7 Sensibilidad Analítica

Se midió teniendo en cuenta la capacidad de discriminar pequeñas diferencias de concentración en un analito. Va a depender de dos factores: la pendiente de la curva de calibrado y de la precisión o desviación estándar. Teniendo en cuenta lo anterior, se examinó la sensibilidad analítica del método correspondiente a la pendiente de la curva de calibración. En la tabla 23 se muestran los valores de las pendientes obtenidas por repetibilidad y precisión intermedia agrupándolas por familias con el fin de comparar cuál de ellas presenta mejor sensibilidad analítica.

Tabla 23. Sensibilidad analítica para repetibilidad y precisión intermedia

CONGÉNERES	Repetibilidad	Precisión intermedia
Alcoholes Superiores		
Isopropanol	209,1	202,0
N – propanol	224,0	193,4
Sec – butanol	236,9	223,4
Iso – butanol	246,7	246,7
N – butanol	236,4	222,2
Alcohol Iso - amílico	506,5	469,2
Alcohol n – amílico	516,4	482,3

Aldehídos		
Acetaldehído	129,3	128,0
2 – metilpropanal	81,9	81,9
Pentanal	137,0	120,8
Hexanal	287,7	243,3
Furfural	325,2	302,2
Heptanal	211,4	175,9
Ésteres		
Acetato de metilo	163,5	140,5
Acetato de Etilo	151,7	126,9
Metil Isobutirato	178,8	147,0
Sec Butilacetato	236,8	198,6
3 – Amilacetato	300,1	202,0
Metanol		
	137,7	137,0

De acuerdo con los resultados anteriores, se observa que para aquellos valores de pendiente que dieron más altos, hay cambios más significativos de señal (alcoholes superiores), lo que indica una mejor respuesta para cambios pequeños de concentración; que para aquellos valores de pendiente bajos (como aldehídos).

6.6 REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA POR SPSS Y EXCEL

En la evaluación a dos niveles (repetibilidad y precisión intermedia), se obtuvieron los siguientes resultados utilizando el paquete estadístico SPSS y Excel:

6.6.1 Prueba de Shapiro Wilk para repetibilidad (método 1)

La aplicación del estadístico W de Shapiro Wilk sirve para definir si se puede trabajar con la media de los datos, lo que significa que la muestra proviene de una población normal. De modo que se plantea la hipótesis nula y la hipótesis alternativa de la siguiente manera:

H₀: “Los datos provienen de una población normal”

H₁: “Los datos no provienen de una población normal”

Efectivamente, el Estadístico de Shapiro Wilk (W) arrojó valores donde el W calculado es menor que el W tabulado (ver tabla para estadístico de la prueba de Shapiro Wilk en el Anexo I para un número de grados de libertad igual a 5 (porque se realizaron 5 inyecciones) con una probabilidad mayor al 95% indicando una

significancia por encima del 0,05. Teniendo en cuenta lo anterior, la hipótesis nula (H_0) se acepta. En la tabla 24 se muestra un resultado representativo del Secbutanol donde aparece que el W calculado para cada nivel de concentración es menor que W tabulado, realizado por SPSS. Los resultados para el resto de congéneres se presentan en el anexo 10.

Tabla 24. Estadístico Shapiro Wilk para Sec butanol

Concentración Sec butanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
2	0,909	0,986
5	0,932	0,986
10	0,940	0,986
20	0,973	0,986
25	0,849	0,986
30	0,810	0,986
35	0,836	0,986
40	0,734	0,986
50	0,897	0,986

gl: grados de libertad = 5

Para un número de grados de libertad (gl) de 5, el W calculado es menor que el W tabulado para un porcentaje de confianza del 95 % (Sig. \geq 0.05) y número de grados de libertad, 5, corresponde a 0,986 para todos los niveles de concentración; por consiguiente la H_0 se acepta.

6.6.2 Prueba de Levene para repetibilidad (método 1)

También se aplicó la prueba de Levene para saber si los datos obtenidos por la repetibilidad y la precisión intermedia provienen de la misma población, donde se encontró el estadístico de Levene (W) tanto para la media como para la mediana, con grados de libertad 1 y 2 de 8 ($k =$ número de muestras, es decir el número de niveles de concentración que corresponde a $9 - 1 = 8$) y 36 (donde N corresponde a 45). Las hipótesis nula y alternativa se plantearon así:

H_0 : “Las muestras son homogéneas”

H_1 : “Las muestras no son homogéneas”

De acuerdo con los valores tabulados para $gl = 8$ y 36 se observa que el estadístico de Levene (W) calculado es menor que el tabulado (cuyo valor está en la tabla presentada en el anexo 21), por lo cual se concluye que las varianzas son homogéneas. De igual manera se presenta un resultado representativo del Sec-

butanol donde aparece el W calculado realizado por SPSS. Los resultados para el resto de congéneres se presentan en el anexo 11.

Tabla 25. Estadístico de Levene para Sec-butanol

Sec butanol	Estadístico Levene (W)	gl ₁	gl ₂
basándose en la media	3,938	8	36
basándose en la mediana	1,245	8	36

De acuerdo con los valores mostrados en la tabla 25, el W calculado dio menor que el W tabulado para número de grados de libertad 8 y 36, el estadístico de Levene tabulado es $W_{(10,50)}=5.9$ para todos los niveles de concentración basándose en la media y en la mediana, escogiendo la media porque se cumplió con la H_0 de Shapiro Wilk.

6.6.3 Coeficiente de Correlación de Pearson para repetibilidad (método 1)

El coeficiente de Correlación de Pearson mostró que las curvas de calibración de los congéneres presentan una linealidad buena para el Sec-butanol con un valor de R por encima de 0,995 cuando se realizó el análisis estadístico mediante el contraste de regresión por ANOVA como se muestra en la tabla 26, para un número total de muestras de 45.

Tabla 26. Coeficiente Correlación de Pearson para Sec butanol

Compuesto	Sec butanol
Correlación de Pearson	0,998
N	45,000

N: número de muestras

Tabla 27. Resumen de Modelo para Sec butanol

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
1	1,000	0,999	0,999

En la tabla 27, se muestra un resumen del modelo de Regresión Lineal, con el Coeficiente de Regresión (**R**) y el Coeficiente de Determinación (**R²**) mostrado en la tabla 27. Para el valor encontrado para R indica que los datos tienen un comportamiento lineal. En el caso del coeficiente de determinación o R cuadrado, el cual menciona en que proporción variaron los datos, se puede decir que el 99% de la variación observada se puede explicar por medio de una línea recta,

indicando así que la calidad del ajuste es satisfactoria y por lo tanto la relación entre los valores de X (concentración) y Y (área) la describe adecuadamente una línea recta. Para el R cuadrado corregido (0,999), se recomienda un valor de al menos 0,7 lo que significa que esta dentro del parámetro permitido.

Tabla 28. Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 X$ con $t_{(0,05; 8)} = 1,859$ para repetibilidad.

t calculado de la pendiente
247,205

$H_0: \beta_0 = 0$
 $H_1: \beta_1 \neq 0$

La hipótesis nula: “la pendiente es significativamente igual a cero”
 La hipótesis alternativa: “la pendiente difiere significativamente de cero”
 $|t_0| > t_{(\alpha/2, n-2)}$

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 28, la hipótesis nula se rechaza, aceptando la hipótesis alternativa: La pendiente es significativamente diferente de cero en un intervalo de confianza de 256,72 a 260,956 y por tanto existe una relación lineal significativa entre la concentración y el área.

6.6.3.1 Análisis de Varianza para el Modelo de Regresión Simple para repetibilidad (método 1)

A continuación aparece un contraste de hipótesis ANOVA para la regresión, que separa la variabilidad explicada por la Regresión y la variabilidad no explicada o Residual, y calcula un estadístico F y una significación estadística para Sec butanol, seguidamente se plantean las siguientes hipótesis

$H_0: \beta_1 = 0$
 $H_1: \beta_1 \neq 0$

La hipótesis nula: “la pendiente es significativamente igual a cero”
 La hipótesis alternativa: “la pendiente difiere significativamente de cero”

Tabla 29. Anova de un factor para Sec butanol

		suma de cuadrados	gl	media cuadrática	F
modelo	regresión	719210511,874	1	719210511,874	61110,549
1	residual	506067,326	43	11769,008	
	total	719716579,200	44		

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 29, en este ejemplo la H_0 se rechaza porque el F experimental es mayor que el F tabulado. $F > F_{(\alpha, 1, n-2)}$ $61110,549 > 3,84$ donde α es 0,05, por lo tanto se concluye que existe asociación entre las dos variables (área y concentración) mediante una regresión lineal. Los resultados de regresión lineal y Anova para los demás congéneres para repetibilidad se presentan en el anexo 12.

6.7 ANÁLISIS DE LA REPETIBILIDAD POR EXCEL (MÉTODO 1)

Para evaluar la repetibilidad mediante el paquete estadístico de Excel, se determinó el valor promedio de las cinco inyecciones, se calculó la desviación estándar, la varianza y el %RSD cuyos resultados se presentan en el anexo 13 (resultados de áreas para el cálculo de repetibilidad para el Método 1). El coeficiente de variación dio por debajo de 3%. Este valor indica que el método es repetible. Este parámetro se examinó mediante las inyecciones repetidas para patrones estándares en un rango de 2 a 50 ppm de congéneres, los cuales se analizaron el mismo día; con los valores de áreas encontrados se halló su respectiva concentración. En la tabla 30 se presenta un ejemplo representativo para Sec butanol y en la figura 9 se registra la curva de calibración obtenida.

Tabla 30. Tabla repetibilidad para Sec butanol

Concentración (ppm)	Media Área	Desviación Estándar	% RSD
2	557	9	2
5	1489	9	1
10	2738	32	1
20	5262	64	1
25	6608	46	1
30	8047	37	2
35	9277	48	1
40	10580	54	1
50	12901	107	1

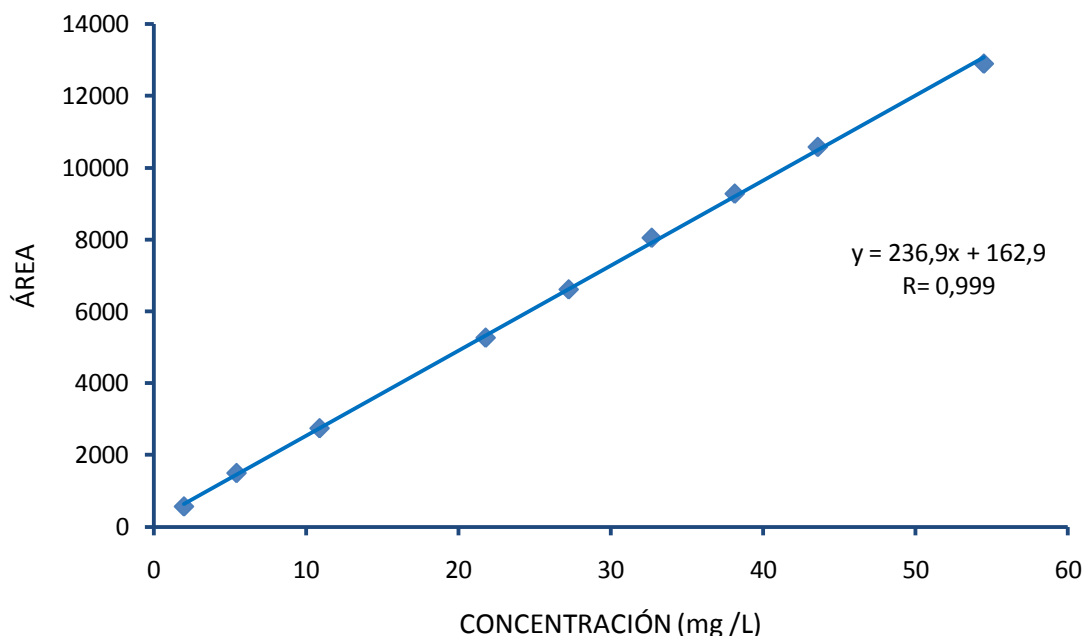


Figura 9. Evaluación de la repetibilidad para Sec butanol

6.8 ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTERMEDIA POR SPSS

6.8.1 Prueba de Shapiro Wilk para precisión intermedia (método 1)

Los valores obtenidos para analizar la precisión intermedia también fueron evaluados por medio del estadístico de Shapiro Wilk (W) donde se tuvo en cuenta la H_0 y la H_1 de la misma forma que para la evaluación de los datos del parámetro repetibilidad. El W calculado es menor que el W tabulado (ver tabla para estadístico de la prueba de Shapiro Wilk en anexo 20.) para un número de grados de libertad igual a 12 (porque N corresponde al número de muestras totales), con una probabilidad mayor al 95% en el 90% de los resultados obtenidos, indicando una significancia por encima del 0,05. Teniendo en cuenta lo anterior, la H_0 de que los datos proceden de una distribución normal, la H_0 se acepta. En la tabla 31 se muestra un resultado representativo del Sec butanol donde aparece el W calculado realizado por SPSS para la precisión intermedia. Los resultados para el resto de congéneres se presentan en el Anexo 10.

Tabla 31. Estadístico Shapiro Wilk Sec butanol (precisión intermedia)

Concentración Sec butanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
2	0,914	0,979
5	0,810	0,979
10	0,941	0,979
20	0,939	0,979
25	0,965	0,979
30	0,902	0,979
35	0,882	0,979
40	0,900	0,979
50	0,882	0,979

grados de libertad: (gl)=12

El W calculado dio menor que el W tabulado para un porcentaje de confianza del 95 % (Sig. ≥ 0.05) y número de grados de libertad, 5, corresponde a 0,979 para todos los niveles de concentración.

6.8.2 Prueba de Levene para la precisión intermedia (método 1)

Para la prueba de homogeneidad de varianza, donde se encontró el estadístico de Levene (W) tanto para la media como para la mediana, con grados de libertad $gl_1 = 8$ y $gl_2 = 99$ debido a:

$gl_1 = 8$ porque ($k-1 =$ donde k es el número de niveles de concentración que corresponde a $9 - 1 = 8$).

$gl_2 = 99$ (donde N es el número total de muestras, es decir 9 niveles por 3 inyecciones, por 4 días daría 108 y $108 - 9$ da 99). Esto es para los grados de libertad de la media.

Las hipótesis nula y alternativa se plantearon del mismo modo que para repetibilidad (ver inciso 6.6.2). De acuerdo con los valores tabulados se observa que el estadístico de Levene (W) calculado es menor que el tabulado, por lo cual se concluye que las varianzas son homogéneas. De igual manera se presenta un resultado representativo del Sec butanol donde aparece el W calculado realizado por SPSS. Los resultados para el resto de congéneres se presentan en el anexo 11. En la tabla 32 se registran los valores del estadístico de Levene calculado para la media y la mediana.

Tabla 32. Estadístico Levene Sec butanol (precisión intermedia)

Sec butanol	Estadístico Levene (W)	gl ₁	gl ₂
basándose en la media	7,629	8	99
basándose en la mediana	6,876	8	99

Teniendo en cuenta que el estadístico de Levene (para la media y la mediana), el W calculado (7,629 y 6,876 respectivamente) dio menor que el W tabulado para número de grados de libertad 8 y 99, el estadístico de Levene tabulado es $W_{(10,100)} = 5.0$ para todos los niveles de concentración basándose en la media y en la mediana, escogiendo la media porque se cumplió con la H_0 de Shapiro Wilk.

6.8.3 Coeficiente de Correlación de Pearson para precisión intermedia (método 1)

El coeficiente de Correlación de Pearson mostró que las curvas de calibración para precisión intermedia de los congéneres presentan una linealidad para un R por encima de 0,995 indicando que es buena como se menciona para el Sec butanol para un número total de 108 muestras como se menciona en la tabla 33.

Tabla 33. Coeficiente Correlación Pearson Sec butanol

Compuesto	Sec butanol
Correlación de Pearson	0,999
N	108

N: número de muestras

En la tabla 34 se muestra un resumen del modelo de Regresión Lineal, con el Coeficiente de Regresión (**R**) y el Coeficiente de Determinación (**R²**) mostrado en la tabla 34. Para el valor encontrado de R indica que los datos tienen un comportamiento lineal. En el caso del coeficiente de determinación o R cuadrado, el cual menciona en que proporción variaron los datos, se puede decir que el 97% de la variación observada se puede explicar por medio de una línea recta, indicando así que la calidad del ajuste es satisfactoria y por lo tanto la relación entre los valores de X (concentración) y Y (área) la describe adecuadamente una línea recta. Para el R cuadrado corregido (0,997), se recomienda un valor de al menos 0,7 lo que significa que esta dentro del parámetro permitido.

Tabla 34. Resumen de Modelo para Sec butanol

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
1	0,999	0,997	0,997

Tabla 35. Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza pendiente	
200,962	241,496	246,308

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

La hipótesis nula: “la pendiente es significativamente igual a cero”

La hipótesis alternativa: “la pendiente difiere significativamente de cero”

$$|t_0| > t_{(\alpha/2, n-2)}$$

De acuerdo con el valor reportado en la tabla 35, se afirma que la hipótesis nula se rechaza, lo que significa que la pendiente es significativamente diferente de cero y por tanto existe una relación lineal significativa entre la concentración y el área.

6.8.3.1 Análisis de Varianza para el Modelo de Regresión Simple para precisión intermedia (método 1)

A continuación aparece un contraste de hipótesis ANOVA para la regresión, que separa la variabilidad explicada por la Regresión y la variabilidad no explicada o Residual, y calcula un estadístico F y una significación estadística para Sec butanol, seguidamente se plantean las siguientes hipótesis

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

La hipótesis nula: “la pendiente es significativamente igual a cero”

La hipótesis alternativa: “la pendiente difiere significativamente de cero”

Tabla 36. Anova de un factor Sec butanol (precisión intermedia)

		suma de cuadrados	gl	media cuadrática	F
modelo	regresión	1532572489,929	1	1532572489,929	40385,795
1	residual	4022520,368	106	37948,305	
	total	1536595010,296	107		

En la tabla 36, la H_0 se rechaza porque el F experimental es mayor que el F tabulado. $F > F_{(\alpha, 1, n-2)}$ donde α es 0,05, por lo tanto se concluye que existe asociación entre las dos variables (área y concentración) mediante una regresión lineal. Los resultados de regresión lineal y Anova para los demás congéneres para precisión intermedia se presentan en el Anexo 12.

6.9 PRECISIÓN INTERMEDIA POR EXCEL (MÉTODO 1)

Para evaluar la precisión intermedia mediante el paquete estadístico de Excel, se determinó el valor promedio de las inyecciones para cada día (3 inyecciones por cada nivel), se calculó la desviación estándar, la varianza y el %RSD cuyos resultados se presentan en el anexo 13 (resultados de áreas para el cálculo de reproducibilidad para el método 1). El coeficiente de variación dio por debajo de 3%. Este valor indica que el método tiene precisión intermedia. Este parámetro se examinó mediante las inyecciones repetidas para patrones estándares en un rango de 2 a 50 ppm de congéneres, los cuales se analizaron en días diferentes; con los valores de áreas encontrados se halló su respectiva concentración. En la tabla 37 y figura 10 se presenta un ejemplo representativo para el Sec butanol.

Tabla 37. Tabla precisión intermedia para Sec butanol

Concentración (ppm)	Media Área	Desviación Estándar	%RSD
2	581,8	34,6	6,0
5	1257,4	113,0	9,0
10	2643,3	89,1	3,4
20	4944,3	36,0	0,7
25	6297,3	97,2	1,5
30	7250,7	312,8	4,3
35	8911,0	70,2	0,8
40	10035,1	69,4	0,7
50	12104,7	123,0	1,0

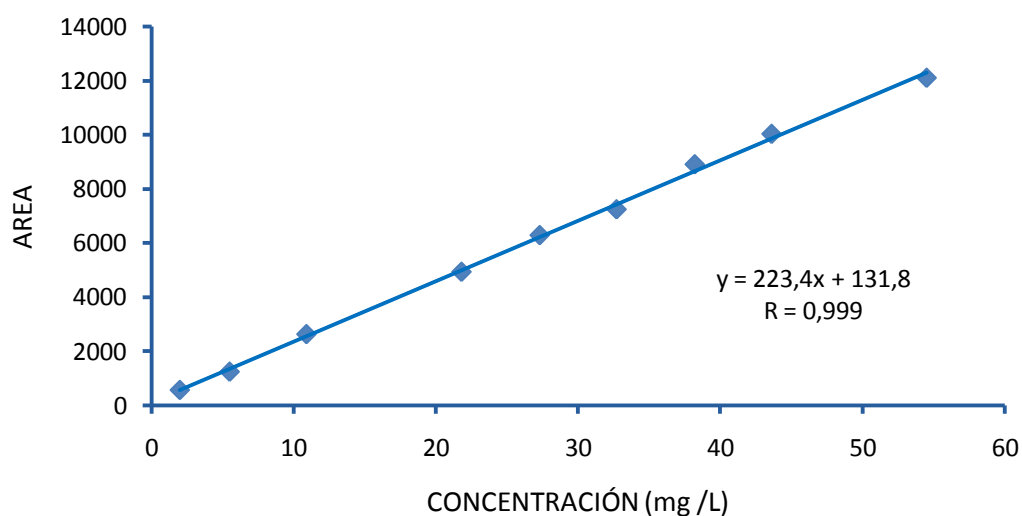


Figura 10. Evaluación de la precisión intermedia para Sec butanol

Finalmente en la figura 11 aparece un cromatograma de los congéneres teniendo en cuenta que se montó una curva de calibración por aparte para el acetaldehído debido a su alta inestabilidad pero con el mismo método.

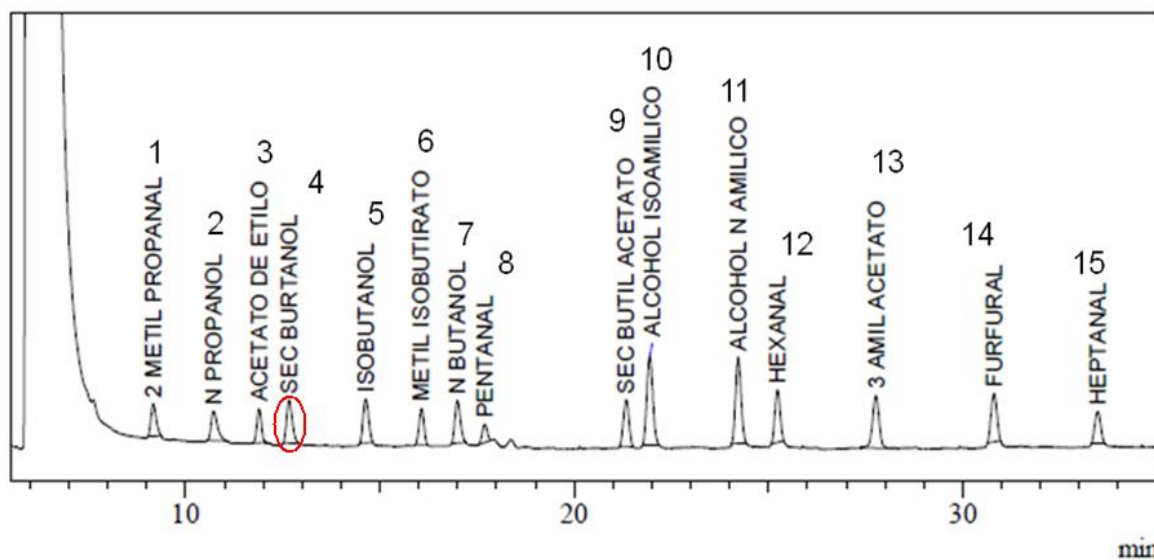


Figura 11. Cromatograma de congéneres obtenido por curvas de calibración (método 1)

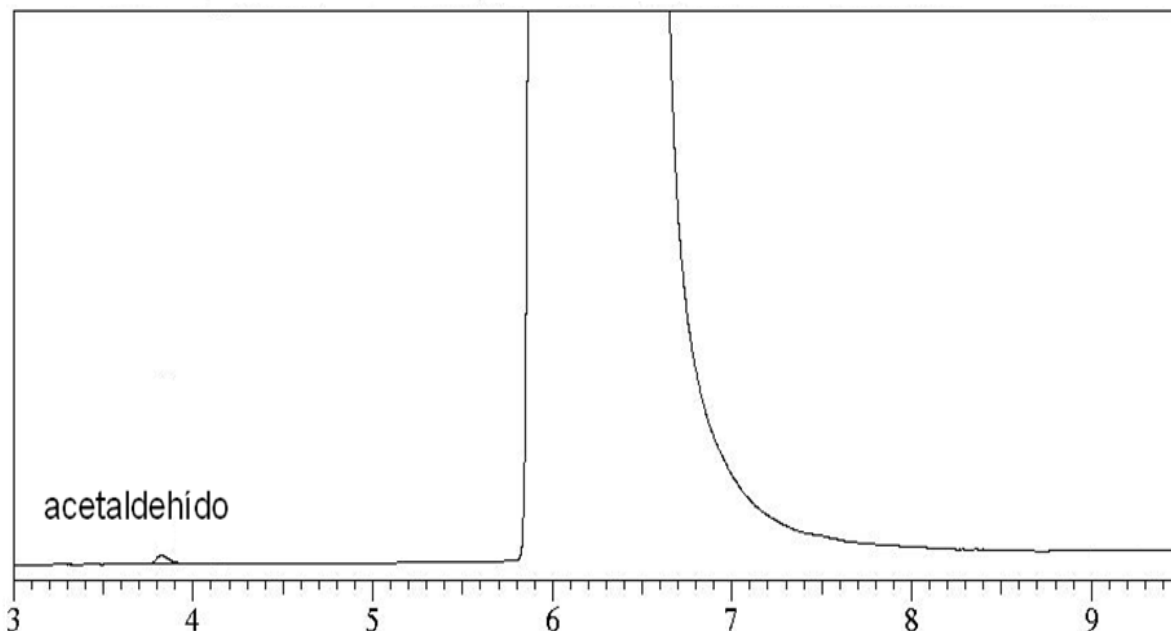


Figura 12. Cromatograma de acetaldehído obtenido por curva de calibración (método 1)

En la figura 12, se presenta un cromatograma para un estándar de acetaldehído a una concentración de 2 mg/L; en el que el pico es muy tenue porque el aldehído es bastante volátil razón por la cual se trabajó por aparte para evitar pérdida y posibles errores en su identificación y cuantificación.

6.10 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD POR SPSS PARA EL MÉTODO 2

6.10.1 *Prueba de Shapiro Wilk (método 2)*

Para el análisis estadístico de los resultados del método 2 se aplicaron las mismas condiciones que para el método 1; y también se cumplió que el estadístico de Shapiro Wilk (W) arroja valores donde el W calculado es menor que el W tabulado (ver tabla para estadístico de la prueba de Shapiro Wilk en el anexo 20. Para un número de grados de libertad igual a 5, con una probabilidad mayor al 95% indicando una significancia por encima del 0,05. Teniendo en cuenta lo anterior, la H_0 se acepta. En la tabla 38 se muestra un resultado representativo del metanol donde aparece el W calculado para cada nivel de concentración el cual es menor que W tabulado, realizado por SPSS. Los resultados para el IPA y AM se presentan en el anexo 14.

Tabla 38. Estadístico Shapiro Wilk Metanol (repetibilidad)

Concentración Metanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
5	0,860	0,986
10	0,801	0,986
20	0,916	0,986
25	0,728	0,986
30	0,920	0,986
35	0,807	0,986
40	0,719	0,986
50	0,902	0,986

Grados de Libertad: (gl)= 5

El W calculado dio menor que el W tabulado para un porcentaje de confianza del 95 % (Sig. ≥ 0.05) y número de grados de libertad, 5, corresponde a 0,986 para todos los niveles de concentración.

6.10.2 Prueba de Levene (repetibilidad) para el método 2

También se aplicó la prueba de homogeneidad de varianza para saber si los datos obtenidos provienen de la misma población, donde se encontró el estadístico de Levene (W) tanto para la media como para la mediana, con grados de libertad $gl_1 = 7$ y $gl_2 = 38$ debido a:

$gl_1 = 7$ porque ($k-1 =$ donde k es el número de niveles de concentración que corresponde a $8 - 1 = 7$).

$gl_2 = 38$ (donde N es el número total de muestras, es decir 8 niveles por 5 inyecciones daría 45 y $45 - 7$ da 38). Esto es para los grados de libertad de la media.

De acuerdo con los valores tabulados para $gl_1 = 7$ y $gl_2 = 38$ se observa que el estadístico de Levene (W) calculado es menor que el tabulado, por lo cual se concluye que las varianzas son homogéneas. De igual manera se presenta un resultado representativo del metanol donde aparece el W calculado realizado por SPSS. Los resultados para los otros dos congéneres (IPA y AM) se presentan en el anexo 15.

Tabla 39. Estadístico de Levene para Metanol

Metanol	Estadístico Levene (W)	gl_1	gl_2
basándose en la media	2,467	7	38
basándose en la mediana	1,432	7	32

De acuerdo con los valores mostrados en la tabla 39, el W calculado dio menor que el W tabulado para número de grados de libertad 7 y 38, el estadístico de Levene tabulado es $W_{(10,50)} = 5.9$ para todos los niveles de concentración basándose en la media y en la mediana, escogiendo la media porque se cumplió con la H_0 de Shapiro Wilk.

6.10.3 Coeficiente de Correlación de Pearson para Repetibilidad (método 2)

El coeficiente de Correlación de Pearson mostró que las curvas de calibración de los 3 congéneres presentan una linealidad para un R por encima de 0,995 indicando que es buena como se muestra para el metanol realizando el análisis estadístico mediante el contraste de regresión por ANOVA como se muestra en la tabla 40 en el caso del metanol.

Tabla 40. Coeficiente Correlacion Pearson para metanol

Compuesto	Metanol
Correlación de Pearson	0,998
N	40

N: número de muestras

En la tabla 41 se muestra un resumen del modelo de Regresión Lineal, con el Coeficiente de Regresión (**R**) y el Coeficiente de Determinación (**R²**)

Tabla 41. Resumen de Modelo para Metanol

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
1	0,998	0,996	0,996

En la tabla 41 el valor encontrado para R indica que los datos tienen un comportamiento lineal. En el caso del coeficiente de determinación o R cuadrado, el cual menciona en que proporción variaron los datos, se puede decir que el 96% de la variación observada se puede explicar por medio de una línea recta, indicando así que la calidad del ajuste es satisfactoria y por lo tanto la relación entre los valores de X (concentración) y Y (área) la describe adecuadamente una línea recta. Para el R cuadrado corregido (0,996), se recomienda un valor de al menos 0,7 lo que significa que esta dentro del parámetro permitido.

Tabla 42. Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza pendiente	
59,159	133,586	143,053

Teniendo en cuenta el valor de t calculado para la pendiente, (59,159) y además que $H_0: \beta_1 = 0$. La hipótesis nula: “la pendiente es significativamente igual a cero”; y $H_1: \beta_1 \neq 0$. La hipótesis alternativa: “la pendiente difiere significativamente de cero” con $|t_0| > t_{(\alpha/2, n-2)}$. La hipótesis nula se rechaza, la pendiente es significativamente diferente de cero y por tanto existe una relación lineal significativa entre la concentración y el área.

Tabla 43. Anova de un factor para Metanol

		suma de cuadrados	gl	media cuadrática	F
modelo	regresión	152759224,802	1	152759224,802	3499,761
1	residual	1658641,973	38	43648,473	
	total	154417866,775	39		

De acuerdo con el valor de F mostrado en la tabla 43 la H_0 se rechaza porque el F experimental es mayor que el F tabulado. $F > F_{(\alpha, 1, n-2)}$ donde α es 0,05, por lo tanto se concluye que existe asociación entre las dos variables (área y concentración) mediante una regresión lineal. Los resultados de regresión lineal y Anova para los demás congéneres para repetibilidad se presentan en el anexo 16.

6.11 REPETIBILIDAD POR EXCEL PARA EL MÉTODO 2

Para evaluar la repetibilidad del método 2 mediante el paquete estadístico de Excel, se realizó el mismo procedimiento que para el método 1. Los resultados se presentan en el anexo 17 (resultados de áreas para el cálculo de repetibilidad para el método 2). El coeficiente de variación dio por debajo de 3%. Este valor indica que el método 2 también es repetible. Este parámetro se examinó mediante las inyecciones repetidas para patrones estándares en un rango de 5 a 50 ppm de metanol, IPA y AM los cuales se analizaron el mismo día; con los valores de áreas encontrados se halló su respectiva concentración. En la figura 13 se presenta un ejemplo representativo para metanol mediante la curva de calibración obtenida.

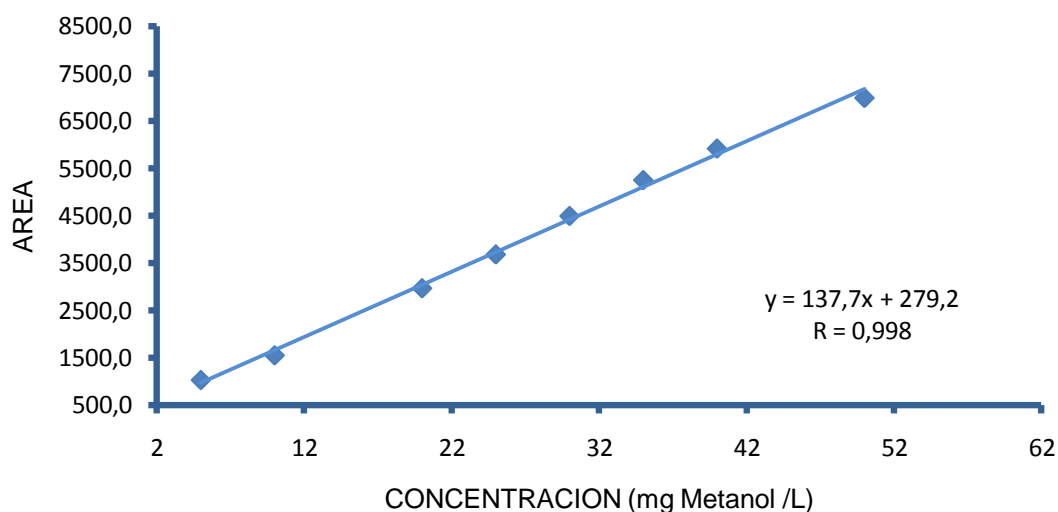


Figura 13. Evaluación de la repetibilidad para Metanol

6.12 Precisión Intermedia por SPSS para el método 2

6.12.1 Prueba de Shapiro Wilk

Los valores obtenidos para analizar la precisión intermedia también fueron evaluados por medio del estadístico de Shapiro Wilk (W) donde se tuvo en cuenta la H_0 y la H_1 de la misma forma que para la evaluación de los datos del parámetro repetibilidad. El W calculado es menor que el W tabulado (ver tabla para estadístico de la prueba de Shapiro Wilk en el anexo 20). Para un número de grados de libertad igual a 12 (porque N corresponde al número de muestras totales), con una probabilidad mayor al 95% en el 90% de los resultados obtenidos, indicando una significancia por encima del 0,05. Teniendo en cuenta lo anterior, la H_0 de que los datos proceden de una distribución normal, se acepta. En la siguiente tabla se muestra un resultado representativo del metanol donde aparece el W calculado realizado por SPSS para la precisión intermedia. Los resultados para los otros dos compuestos se presentan en el anexo 14.

Tabla 44. Estadístico Shapiro Wilk metanol (precisión intermedia)

Concentración metanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
5	0,933	0,979
10	0,850	0,979
20	0,892	0,979
25	0,838	0,979
30	0,919	0,979
35	0,898	0,979
40	0,919	0,979
50	0,837	0,979

Grados de Libertad: (gl)= 12

Según los valores de la tabla 44, el W calculado dio menor que el W tabulado para un porcentaje de confianza del 95 % (Sig. ≥ 0.05) y número de grados de libertad, 5, corresponde a 0,979 para todos los niveles de concentración.

6.12.2 Prueba de Levene para método 2

También se aplicó la prueba de homogeneidad de varianza para saber si los datos obtenidos provienen de la misma población, donde se encontró el estadístico de Levene (W) tanto para la media como para la mediana, con grados de libertad $gl_1 = 7$ y $gl_2 = 88$ debido a:

$gl_1 = 7$ porque ($k-1 =$ donde k es el número de niveles de concentración que corresponde a $8 - 1 = 7$).

$gl_2 = 88$ (donde N es el número total de muestras, es decir 8 niveles por 12 inyecciones en total daría 96 y luego $N-k = 88$).

Esto es para los grados de libertad de la media. De acuerdo con los valores tabulados para $gl_1 = 7$ y $gl_2 = 88$ se observa que el estadístico de Levene (W) calculado es menor que el tabulado, por lo cual se concluye que las varianzas son homogéneas. De igual manera se presenta un resultado representativo del metanol donde aparece el W calculado realizado por SPSS. Los resultados para los otros dos congéneres se presentan en el anexo 15.

Tabla 45. Estadístico Levene metanol (precisión intermedia)

Metanol	Estadístico Levene (W)	gl_1	gl_2
basándose en la media	5,252	7	88
basándose en la mediana	3,342	7	88

El W calculado dio menor que el W tabulado para número de grados de libertad 7 y 88, el estadístico de Levene tabulado es $W_{(10,50)} = 5.9$ para todos los niveles de concentración basándose en la media y en la mediana, escogiendo la media porque se cumplió con la H_0 de Shapiro Wilk.

6.12.3 Coeficiente de Correlación de Pearson para método 2

El coeficiente de Correlación de Pearson mostró que las curvas de calibración para precisión intermedia de los tres compuestos presentan una linealidad para un R por encima de 0,995 indicando que es buena como se muestra para el Metanol en la tabla 46.

Tabla 46. Coeficiente Correlación Pearson metanol (precisión intermedia)

Compuesto	Metanol
Correlación de Pearson	0,977
N	96

N: número de muestras

En la tabla 47 se muestra un resumen del modelo de Regresión Lineal, con el Coeficiente de Regresión (**R**) y el Coeficiente de Determinación (**R²**). Para el valor encontrado de R indica que los datos tienen un comportamiento lineal. En el caso del coeficiente de determinación o R cuadrado, el cual menciona en que proporción variaron los datos, se puede decir que el 91% de la variación observada se puede explicar por medio de una línea recta, indicando así que la calidad del ajuste es satisfactoria y por lo tanto la relación entre los valores de X (concentración) y Y (área) la describe adecuadamente una línea recta. Para el R cuadrado corregido (0,982), se recomienda un valor de al menos 0,7 lo que significa que esta dentro del parámetro permitido.

Tabla 47. Resumen de Modelo para Metanol

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
1	0,991	0,991	0,982

En la tabla 48 aparece un contraste de hipótesis ANOVA para la regresión, que separa la variabilidad explicada por la Regresión y la variabilidad no explicada o Residual, y calcula un estadístico F y una significación estadística para metanol.

Tabla 48. Anova de un factor Metanol (precisión intermedia)

		suma de cuadrados	gl	media cuadrática	F
modelo	regresión	736019450,491	1	736019450,491	5177,878
1	residual	13361810,749	94	142146,923	
	total	749381261,240	95		

En este ejemplo es estadísticamente significativo ($p < 0,001$) y concluye rechazando la hipótesis nula y aceptando la H_1 (existe asociación entre las dos variables mediante una regresión lineal).

Los resultados de regresión lineal y Anova para los demás congéneres se presentan en el anexo 16.

6.13 PRECISIÓN INTERMEDIA POR EXCEL PARA EL MÉTODO 2

Para evaluar la precisión intermedia mediante el paquete estadístico de Excel, se determinó el valor promedio de las inyecciones para cada día (3 inyecciones por cada nivel), se calculó la desviación estándar, la varianza y el %RSD cuyos resultados se presentan en el anexo 17 (resultados de áreas para el cálculo de precisión intermedia para el Método 2). El coeficiente de variación dio por debajo de 3%. Este valor indica que el método tiene precisión intermedia. Este parámetro se examinó mediante las inyecciones reproducibles para patrones estándares en un rango de 5 a 50 ppm de los tres compuestos, los cuales se analizaron en 4 días diferentes; con los valores de áreas encontrados se halló su respectiva concentración. En la tabla 49 se presenta un ejemplo representativo para el metanol y su curva de calibración.

Tabla 49. Evaluación de la precisión intermedia del Metanol

Concentración (ppm)	Media Área	Desviación Estándar	%RSD
5	1055,3	23,9	2,3
10	1551,3	28,1	1,8
20	2068,2	21,7	1,0
25	2555,3	17,2	0,7
30	3385,8	64,7	1,9
35	4014,1	7,1	0,2
40	4528,9	6,7	0,1
50	5011,4	3,0	0,1

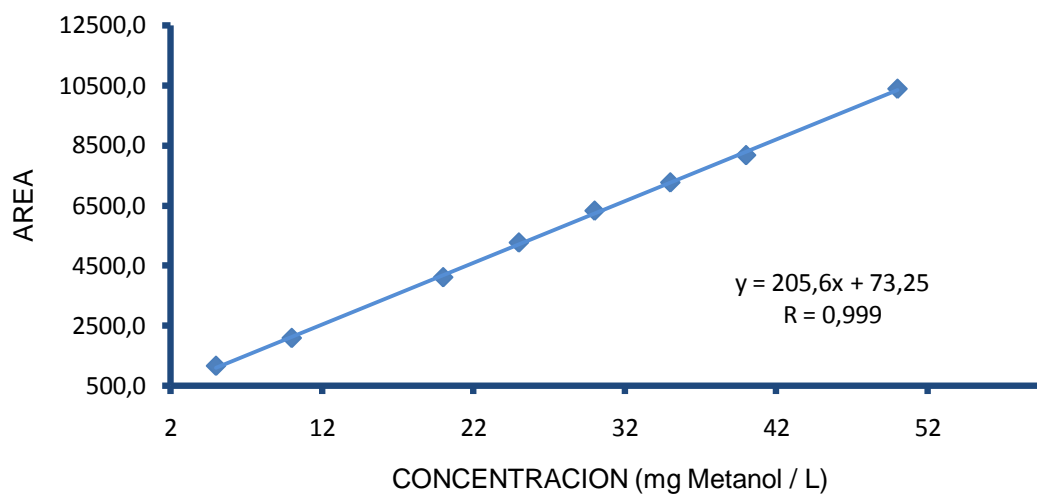


Figura 14. Evaluación de la precisión intermedia del Metanol

La figura 14 muestra que la relación entre los valores del eje X (concentración) y los del eje Y (área), describen adecuadamente una línea recta.

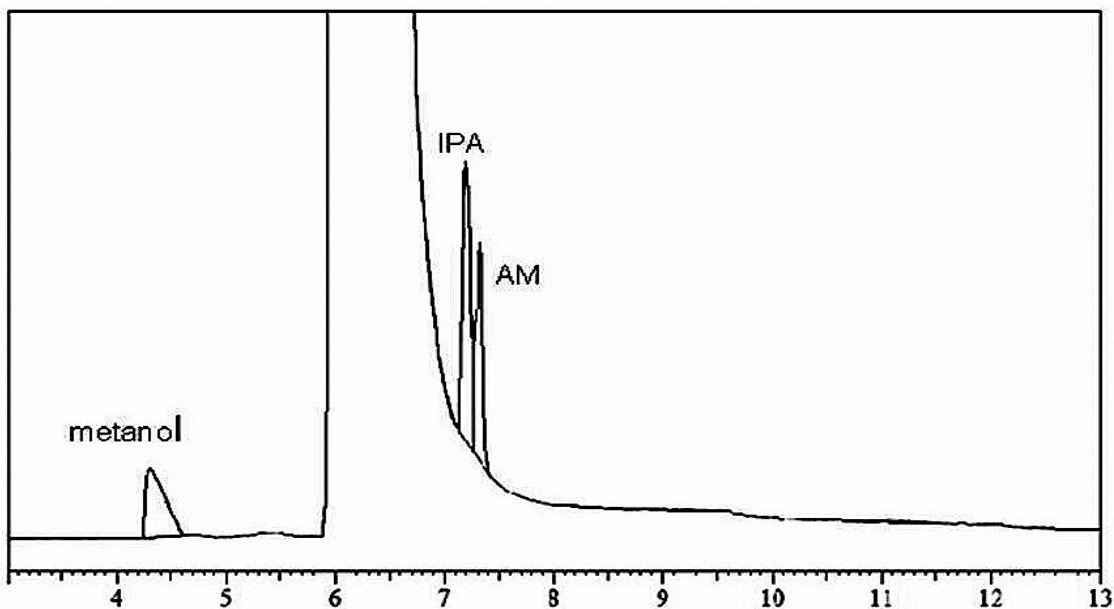


Figura 15. Cromatograma obtenido para método 2

En la figura 15 se muestra el cromatograma obtenido para el método 2 de los tres compuestos (Metanol, IPA, A.M.), donde se observa la separación de los dos compuestos y su identificación.

6.7 ANÁLISIS DE ANOVA POR EXCEL

6.7.1 Comparación de dos medias experimentales, prueba t método 1 y 2

Se realizó un paquete estadístico por Excel aplicando el parámetro t de medias entre los valores obtenidos por repetibilidad y precisión intermedia para comparar si las dos medias difieren significativamente o no, en el caso de la prueba t se tiene que para la comparación de las medias la H_0 : “Las dos medias no difieren significativamente” y la H_1 : “Las medias difieren significativamente”. Para el caso del Sec butanol, como las desviaciones estándar no son iguales, se calculó el estadístico t utilizando las ecuaciones 16 y 17. En la tabla 50 se presenta el valor del estadístico t a un 95 % de confianza.

Tabla 50. Comparación de medias para Sec butanol

Concentración (ppm) Sec butanol	gl	t calculado	t tabulado*
2	14	2	2
5	11	7	2
10	15	3	2
20	5	10	3
25	15	9	2
30	12	9	2
35	11	12	2
40	10	17	2
50	9	13	2

gl: grados de libertad
*95%vconfianza

La hipótesis nula se acepta, en el primer nivel de concentración indicando que no hay diferencia significativa entre las dos medias, mientras que en los demás niveles la hipótesis nula se rechaza (existencia de errores aleatorios), (ver tabla en anexo 22). Este resultado se puede explicar indicando que probablemente haya ocurrido una volatilización del analito. En el anexo 18 aparecen los resultados de la comparación de medias para los demás congéneres del método 1 donde para algunos compuestos ocurre lo mencionado en el caso anterior, mientras que para los demás para algunos niveles se acepta la hipótesis nula, mientras que para otros se rechaza, es decir, no se puede asumir que los compuestos se volatilizaron en todos los casos. Así mismo se realizó la comparación de dos medias, es decir la prueba t para el método 2. Esto significa que hay evidencia de errores sistemáticos y para ello se realizó una prueba F.

6.7.2 Estadístico F para método 1 y 2

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por la comparación de las dos medias experimentales, se realizó una prueba F para saber si las varianzas (la obtenida por repetibilidad y la precisión intermedia), difieren significativamente. Para ello, fue adecuado un contraste de dos colas, teniendo en cuenta que si el valor obtenido experimentalmente, F es menor que el F tabulado, la hipótesis nula se acepta; (ver tabla en el anexo 24).

Prueba F

Hipótesis nula: "Las varianzas son iguales"

Hipótesis alternativa: "Las varianzas no son iguales"

Tabla 51. Comparación varianzas para Sec butanol

Conc*. Sec butanol (ppm)	F calculado	F tabulado
2	3	4
5	149	7
10	6	4
20	4	7
25	4	7
30	57	4
35	1	4
40	1	4
50	1	7

Conc*: concentración

Como se ve en la tabla 51, se aceptó la H_0 para 10, 20, 25, 35, 40, 50 ppm, lo que significa que los casos en los que los resultados fueron rechazados, indicando que hay presencia de errores sistemáticos; sin embargo se tuvieron en cuenta porque se analizó cada resultado donde la H_0 se rechazaba y generalmente esto ocurrió a altas concentraciones y la NTC 620 por ejemplo en el caso del Sec butanol, permite hasta 50 ppm de este compuesto en las bebidas alcohólicas, de tal modo que cualquier presencia por encima de este valor de concentración significa que el alcohol no sería apto para la elaboración de la bebida. De igual manera se analizaron los resultados para los demás congéneres y para cada nivel de concentración. En el caso donde no hubiese dado como cierta la H_0 en aquellas concentraciones por debajo del límite permitido por la norma, sería necesario descartar esos niveles aplicando una prueba Q o una prueba G. Además para aquellos congéneres donde no se aceptó la hipótesis nula tanto en la comparación de medias como para la prueba F indica evidencia de errores personales, errores

de método (relacionados con los parámetros de integración), o errores del equipo. Lo anterior es de gran importancia porque de acuerdo con los resultados obtenidos obligan a realizar un mejoramiento en la implementación del método. Los resultados de la prueba F para los demás congéneres se presentan en el anexo 19.

7. LINEALIDAD

Se examinó la linealidad de los datos obtenidos para los estándares en un intervalo de concentraciones desde 2 hasta 50 mg/L definiendo la función que mejor explica la relación entre las variables a través del Coeficiente de Correlación de Pearson (tanto para el método 1 como para el método 2, en los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia), encontrando una buena linealidad entre las dos variables ($R \cong 1$). Para corroborar lo anterior referirse al anexo 12.

8. ROBUSTEZ DEL MÉTODO

Para evaluar la robustez del método, se prepararon 3 soluciones estándar de propanol de diferente concentración (15 y 30 mg/L) se refrigeraron a una temperatura de 15°C y se realizaron inyecciones por triplicado por tres días consecutivos y luego se volvieron a preparar a las mismas condiciones después de dos meses. Al realizar estas inyecciones por el método ya calibrado en el equipo de cromatografía, se obtuvieron las concentraciones esperadas indicando que el método está calibrado y es robusto. En la tabla 52 se muestran los resultados de las concentraciones obtenidas.

Tabla 52. A) Resultados concentraciones estándar de propanol a 15 ppm

núm. de inyecciones	concentración
1	15,364
2	14,949
3	15,484
media	15,266
desviación estándar	0,281
%RSD	1,839

Tabla 52. B) Resultados concentraciones estándar de propanol a 30 ppm

núm. de inyecciones	concentración
1	30,621
2	31,047
3	32,001
media	31,223
desviación estándar	0,707
%RSD	2,263

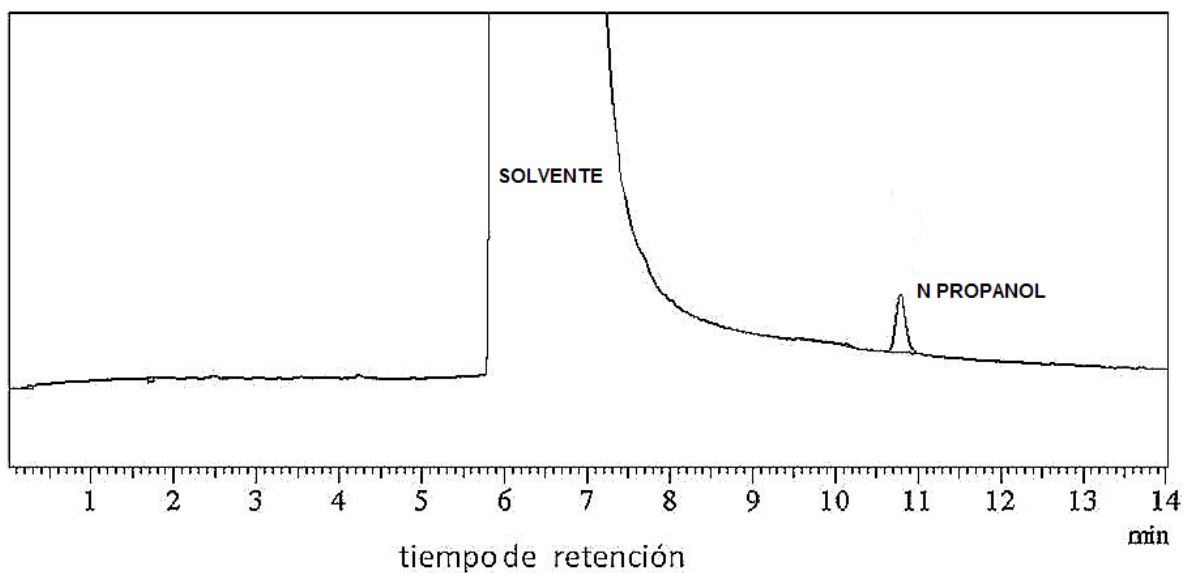


Figura 17. Cromatograma estándar n-propanol

La figura 17 representa el cromatograma obtenido por el método calibrado utilizando las condiciones mencionadas en el numeral 8.

9. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Para el análisis de muestras reales, se recogieron muestras provenientes de la sección de preparación donde se almacena el alcohol y se les midió el grado alcohólico el cual estaba dentro de los límites permitidos, luego se inyectó la muestra utilizando el método ya calibrado teniendo en cuenta que este método es aplicable en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 mg/L de solución. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 53 tanto para los 16 congéneres del método 1, como para el método 2:

Tabla 53. Resultados análisis de muestras reales

semana 1	
muestra 1	Sec Butil acetato
muestra 1	alcohol Isoamílico
concentración	dentro de límite permitido
semana 2	
muestra 2	Sec Butil acetato
concentración	dentro de límite permitido
semana 3	
muestra 3	Sec Butil acetato
concentración	dentro de límite permitido

Con los resultados se observó que los valores obtenidos son confiables y que las muestras cumplen con la cantidad mínima permitida para la elaboración de bebidas alcohólicas tipo aguardiente.

10. CONCLUSIONES

- ✓ La técnica analítica cromatográfica (GC/FID) implementada y estandarizada para la determinación de diecinueve congéneres en concentraciones menores a 50 ppm, en alcohol extra neutro rectificado empleado para la elaboración de bebidas alcohólicas tipo aguardiente en la Industria Licorera del Cauca, generó buena confiabilidad y precisión porque los parámetros tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia, mostraron resultados aceptables (los %CV se encuentran por debajo del 3%; para los dos parámetros estadísticos) indicando que el método estandarizado es preciso.
- ✓ Los parámetros de calidad como el LOD (< 0,9 ppm), LOQ, (< 2,0 ppm) Intervalo Lineal, Selectividad, Sensibilidad; arrojaron resultados los cuales sirvieron para saber el grado de certeza en la determinación de congéneres menores a 50 ppm con el fin de identificar y cuantificar este tipo de sustancias en bebidas alcohólicas.
- ✓ La herramienta estadística utilizada como el SPSS en la cual vienen involucradas pruebas paramétricas como Shapiro Wilk, Levene, Pearson, ANOVA (Análisis de Varianza) entre otras; sirvieron para comprobar la confiabilidad en los resultados obtenidos mediante el análisis de estas pruebas, concluyendo así que los datos arrojados con la utilización de este método son repetibles y reproducibles cuando se realizó la estandarización del método. Esto indica un aumento en el grado de certeza del resultado.
- ✓ La estandarización del método analítico incidió en el mejoramiento de la técnica porque permitió cuantificar congéneres en concentraciones por debajo de las exigidas por la norma ICONTEC. Debido a esto se aprecia que la calidad del alcohol extra neutro rectificado empleado en la elaboración de las bebidas alcohólicas en la *I.L.C.* cumple con las normas que exige el ICONTEC para la comercialización de aguardiente.
- ✓ Al realizar la estandarización de la técnica (GC/FID) y comprobar que el método es repetible y reproducible fueron causas para el mejoramiento del INCC y para la creación de un POE.
- ✓ Los resultados del presente trabajo fueron expuestos ante las directivas de la *I.L.C.* y como complemento del mismo se realizó una capacitación al personal requerido, acerca de la utilización y el conocimiento general del uso del Cromatógrafo de Gases y el modo de Inyección de una muestra de alcohol en

la Licorera del Cauca, quedando constancia en el área de Talento Humano de la empresa.

- ✓ Aunque en principio la *I.L.C.* requería un menor tiempo de análisis de las muestras, la metodología realizada muestra dos métodos que exceden en unos minutos al método creado inicialmente por la *I.L.C.* pero el grado de certeza de los resultados obtenidos con el método ya estandarizado es mayor. Además el software utilizado permite el análisis de la misma muestra una vez se ha hecho una post corrida.

11. RECOMENDACIONES


- Debido a que los congéneres son sustancias volátiles, es necesario preservar la muestra a una temperatura menor de 15°C antes de hacer el análisis porque de lo contrario se perderán algunos compuestos y los resultados serán variables; además de realizar el análisis inmediatamente llegue la muestra al laboratorio.
- Se recomienda llevar un registro de número de inyecciones realizadas en el Cromatógrafo de Gases de la *I.L.C.* para estar cambiando los *septum*, y limpiar el *liner* del inyector.
- Es importante leer las instrucciones de encendido y apagado del Cromatógrafo de Gases para tener un mejor cuidado del equipo.
- El primer paso para la validación, es la estandarización; como la *I.L.C.* ya cuenta con la estandarización del método para bebidas alcohólicas es muy importante realizar la validación porque así la empresa puede certificar el laboratorio y además ofrecer un servicio a las otras entidades productoras de bebidas alcohólicas.
- El Cromatógrafo de gases, debe tener un control adecuado y permanente de mantenimiento tanto del equipo, como de las partes que lo componen que debe ser efectuado por el personal técnico especializado.

ANEXO 1

VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DE LA BALANZA ANALÍTICA

Certificado de Calibración

Certificate of Calibration

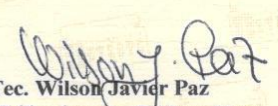
 **Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA**

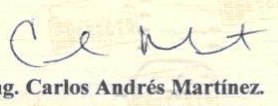
Número: **9874 C**
Number

Acreditación N° 25295 de Septiembre 04 de 2003

**LABORATORIO DE METROLOGIA DETECTO DE COLOMBIA LTDA
MASA Y BALANZAS**

INSTRUMENTO <i>Apparatus</i>	:	BALANZA ANALÍTICA
FABRICANTE <i>Manufacturer</i>	:	OHAUS
MODELO <i>Model</i>	:	AR 2140
NUMERO DE SERIE <i>Serial Number</i>	:	N0158329050177
RANGO DE MEDICION <i>Measurement Range</i>	:	0,01 g - 210 g
SOLICITANTE <i>Customer</i>	:	INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA
DIRECCION DEL SOLICITANTE <i>Customer Address</i>	:	CALLE 4 N° 1E - 40 BARRIO BELÉN (POPAYAN)
FECHA DE RECEPCION DEL EQUIPO <i>Date of equipment reception</i>	:	2009 -05 -08
FECHA DE CALIBRACION <i>Date of calibration</i>	:	2009 -05 -08
NUMERO DE PAGINAS DEL INFORME INCLUYENDO ANEXOS <i>Number of pages of this Certificate and Documents Attached</i>	:	Ocho (8)
FIRMA(S) AUTORIZADA(S) <i>Authorized signatory (ies)</i>		


Tec. Wilson Javier Paz
Calibrado por - Calibrated by:


Ing. Carlos Andrés Martínez
Revisado por - Checked by:

Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. No podrá ser reproducido total o parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del laboratorio que lo emite.

This certificate is an accurate record of the results of measurements performed. This Certificate may not be total or partially reproduced, except with the prior written permission of the issuing laboratory.

Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados.

The results of this certificate refer to the moment and conditions in which the measurements were made. The issuing Laboratory assumes no responsibility for damages ensuing misuse of the calibrated instruments.

Cali Calle 5B4 No. 38-75 B/. San Fernando - PBX: 558 6060 Fax: 558 6161
Bogotá D.C. Calle 91 No. 49 A-24 B/. La Castellana PBX: 634 8182 Fax: 634 8173
E-mail: cali@detectodecolombia.com E-mail: detectobogota@hotmail.com E-mail: detectomed@telmex.net.co
www.detectocolombia.com

Continuación Anexo 1. Verificación de Calibración de la Balanza Analítica

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN



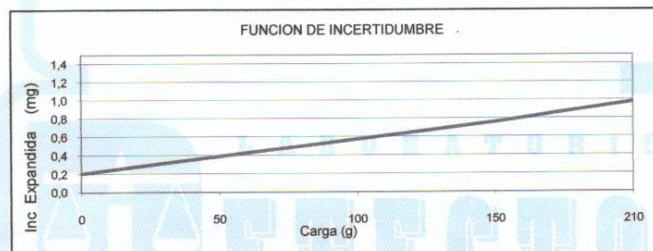
Acreditación No. 25295
Septiembre 04 de 2003

Número: 9874 C
Página 8 de 8

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA

$$U = u_0 + b m_{wi}$$
$$U = 2,08E-04 + 3,68E-06 m_{wi}$$

m_{wi} valor del objeto a pesar.
Incertidumbre expandida en gramos con $k = 2$



8. OBSERVACIONES

1. La balanza debe estar encendida mínimo con media hora de antelación a cualquier medición.
2. Revisar periódicamente el ajuste de las balanzas y éste debe hacerse con pesas patrón
3. A la balanza se le realizó ajuste:
 - 3.1 Datos antes de ajuste: 100 g = 100,0006
 - 3.2 Datos después de ajuste: 100 g = 100,0001

FIRMA(S) AUTORIZADA(S)

Authorized signatory (ies)

Tec. Wilson Javier Paz

Elaborado por - Prepared by:

FECHA DE EXPEDICIÓN

Date of Issue

2009 -05 -15

**Continuación Anexo 1. VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN
CROMATÓGRAFO DE GASES**

221-30991-09

Certificate of Compliance

This certifies that the equipment described below:

- Complies with the design criteria of the Shimadzu R&D department.
- Has been tested by the qualified personnel representing the Shimadzu Quality Assurance department.
- Has been found to meet or exceed the documented specifications pertaining to the model described.

Test procedures and documentation protocols are developed to adhere to Shimadzu's ISO 9001 Quality Management System. The Quality Management system has been reviewed and accepted by a committee consisting of the Quality Assurance department, the R&D department, the Analytical & Measuring Instruments Plant and Senior Management.

Instrument Model : AOC-20i

Serial Number : C11144207866KG

Date Inspected : JUN. -7. 2004 Certified by : N. Satoh

Manager of Quality Assurance Department
Analytical & Measuring Instruments Division
Shimadzu Corporation



Continuación Anexo 1. Verificación de Calibración Transfer Pipeta

ESPECIFICACIONES TRANSFERPIPETA BRAND

Volumen nominal	10,0 μ L
Serie: 09Z8141	Serie: 09Z8141
Exactitud: 0,19%	Coficiente de variación media: 0,46%

ANEXO 2

VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN MATERIAL DE VIDRIO

- Control de Medios de Análisis Simplificado

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \times Z$$

Equivalentes:

V_{20} [mL]: volumen del aparato de medida a 20 °C

W_1 [g]: valor obtenido de la pesada del aparato de medida sin carga/o sea antes de vaciar el contenido.

W_2 [g]: valor obtenido de la pesada del aparato de medida lleno/o sea después de vaciar el contenido.

Z [mL/g]: factor de los parámetros de control resumidos

- Resultados por Volumen

Ejemplo Representativo:

Cálculo para encontrar el verdadero volumen (V_{20}):

Para un matraz de 25 mL, el balón #1:

$$W_1 = (46,1554 - 21,2390) \times 1,00321$$

$$V_{20} = 24,9963 \text{ mL}$$

$$W_1 = (46,1551 - 21,2390) \times 1,00321$$

$$V_{20} = 24,9960 \text{ mL}$$

$$W_1 = (46,1550 - 21,2389) \times 1,00321$$

$$V_{20} = 24,9960 \text{ mL}$$

Ahora:

$$24,9963 - 24,9960 = 3,0 \times 10^{-4}$$

$$3,0 \times 10^{-4} \times \frac{1}{4} = 7,5 \times 10^{-5}$$

$$7,5 \times 10^{-5} \approx 0,000075 < 0,04$$

Nota: En el anexo 24 se encuentra tabla para el factor Z

Continuación anexo 2

Resultados Factor "Z"

Resultados obtenidos para cada matraz

matraz 100 mL	prueba (1/4)	resultado <0,1 mL	V ₂₀ (mL)	media V ₂₀ (mL)
balón #1	1,0x10 ⁻⁴	0,000025	100,013	99,9069
	1,0x10 ⁻⁴	0,000025	99,849	
	1,0x10 ⁻⁴	0,000025	99,859	
balón # 2	0,0314	0,00785	99,947	100,4500
	1,2x10 ⁻³	0,00012	100,360	
	1,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	101,043	
balón #3	1,5x10 ⁻³	0,01292	99,968	100,0488
	3,0x10 ⁻⁴	3,74x10 ⁻⁴	100,120	
	0,0517	7,5x10 ⁻⁵	100,058	
balón #4	1,0x10 ⁻⁴	0,000025	100,444	100,2152
	1,0x10 ⁻⁴	0,000025	100,170	
	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	100,032	
balón #5	0,0246	6,15x10 ⁻³	99,907	99,9379
	0,1818	0,04545	99,978	
	9,0x10 ⁻⁴	2,25x10 ⁻⁴	99,929	
balón #6	0,2353	0,05883	100,422	100,1394
	3,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	99,982	
	1,0x10 ⁻³	2,5x10 ⁻⁴	100,014	

Resultados obtenidos para matraz 50 mL

matraz 50 mL	prueba (1/4)	resultado <0,1 mL	V ₂₀ (mL)	media V ₂₀ (mL)
balón #1	2,0x10 ⁻³	5,0x10 ⁻⁴	49,875	49,8979
	0,299	0,0074	49,860	
	0,019	0,00475	49,958	
balón #2	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁵	49,921	49,9396
	1,5x10 ⁻³	3,75x10 ⁻⁴	49,903	
	5,0x10 ⁻⁴	1,25x10 ⁻⁴	49,994	
balón #3	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁵	49,922	49,8923
	1,0x10 ⁻³	2,5x10 ⁻⁴	49,860	
	0,061	0,01525	49,895	
balón #4	4,0x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁴	50,075	49,9682
	4,0x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁴	49,883	
	3,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	49,947	
balón #5	3,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	49,904	49,9886
	0,0785	0,01963	50,060	
	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁵	50,002	
balón #6	9,6x10 ⁻³	0,0024	50,030	50,0067
	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	49,940	
	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	50,050	
balón #7	6,0x10 ⁻⁴	1,5x10 ⁻⁴	50,035	50,0108
	1,6x10 ⁻³	4,0x10 ⁻⁴	50,002	
	1,3x10 ⁻³	3,25x10 ⁻⁴	49,995	

Resultados obtenidos para matraz 25 mL

matraz 25 mL	prueba (1/4)	resultado <0,1 mL	V ₂₀ (mL)	media V ₂₀ (mL)
balón #1	3,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	24,996	25,0579
	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁵	25,055	
	0,0827	0,02067	25,123	
balón #2	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁵	24,974	24,9620
	4,0x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁴	24,944	
	0,0803	0,02007	24,968	
balón #3	0	0	24,991	24,9714
	2,8x10 ⁻³	7,0x10 ⁻⁴	24,957	
	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	24,966	
balón #4	3,9x10 ⁻³	9,7x10 ⁻⁴	25,000	24,9796
	0,0348	8,7x10 ⁻³	25,038	
	3,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	24,901	
balón #5	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	24,964	24,9565
	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	24,904	
	0,087	0,02175	25,002	
balón #6	1,5x10 ⁻³	3,75x10 ⁻⁴	24,954	24,9509
	0,01024	0,0256	24,979	
	2,9x10 ⁻³	7,25x10 ⁻⁴	24,919	
balón #7	7,0x10 ⁻⁴	1,75x10 ⁻⁴	24,967	24,9692
	2,8x10 ⁻³	7,0x10 ⁻⁴	24,898	
	3,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁵	25,043	

Resultados obtenidos para matraz 10 mL

matraz 10 mL	prueba (1/4)	resultado <0,1 mL	V ₂₀ (mL)	media V ₂₀ (mL)
balón #1	2,0x10 ⁻⁴	0,00005	9,969	9,9886
	2,0x10 ⁻⁴	0,00005	9,982	
	2,0x10 ⁻⁴	5,0X10 ⁻⁵	10,015	
balón #2	2,0x10 ⁻⁴	0,00005	9,945	9,9834
	0,0004	0,000025	9,988	
	2,0x10 ⁻⁴	5,0X10 ⁻⁵	10,017	
balón #3	2,1x10 ⁻³	5,25x10 ⁻⁴	9,976	9,9835
	1,8x10 ⁻³	4,5x10 ⁻⁴	9,925	
	2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁵	10,049	
balón #4	0	0	10,024	9,9989
	2,2x10 ⁻³	5,5x10 ⁻⁴	9,986	
	0,033	8,25x10 ⁻³	9,987	

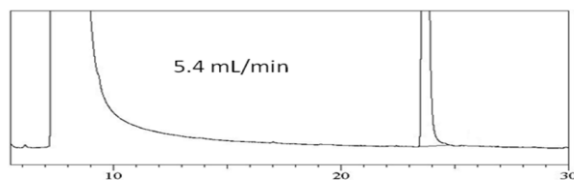
ANEXO 3

CONCENTRACIONES REALES OBTENIDAS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE CONGÉNERES

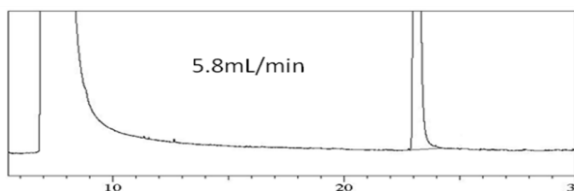
Compuesto	Concentración teórica (ppm)	Concentración real (ppm)
Acetaldehído	100	103
Metanol	100	103
Isopropanol	100	102
Acetato de Metilo	100	99
2 metil Propanal	100	101
N propanol	100	102
Acetato de etilo	100	103
Sec butanol	100	101
Iso butanol	100	99
Metil Isobutirato	100	102
N butanol	100	104
Pentanal	100	101
Sec Butil acetato	100	99
Iso – Amílico	100	100
Alcohol n – amílico	100	103
Hexanal	100	102
3 Amil acetato	100	99
Furfural	100	98
Heptanal	100	103

ANEXO 4

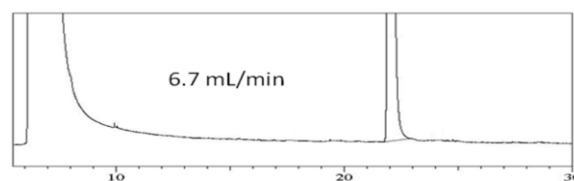
CROMATOGRAMAS OBTENIDOS PARA EL ANÁLISIS DEL FLUJO ÓPTIMO



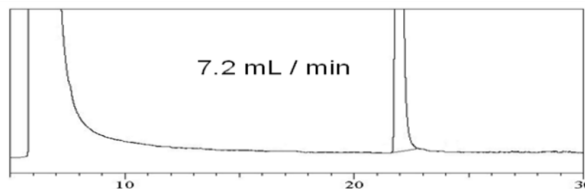
a.



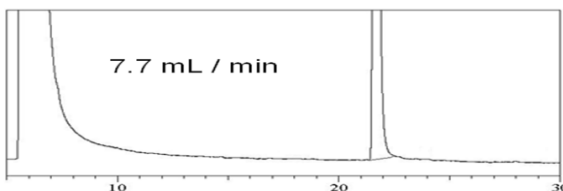
b.



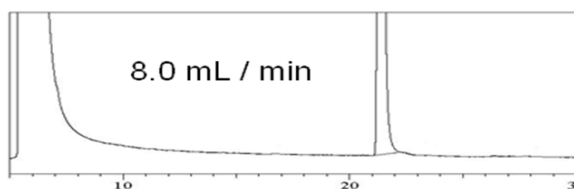
c.



d.



f.



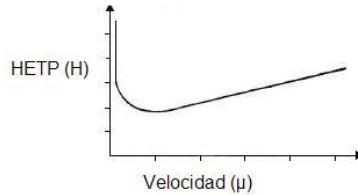
g.

Tiempo (minutos)

Cromatogramas obtenidos para análisis de la *Curva de Golay*. a) flujo a 5,4 mL/min; b) flujo a 5,8 mL/min; c) flujo a 6,7 mL/min; d) flujo a 7,2 mL/min; e) flujo a 7,7 mL/min; f) flujo a 8,0 mL/min

ANEXO 5

DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD LINEAL Y FLUJO ÓPTIMO DE UNA COLUMNA CROMATOGRÁFICA EMPLEANDO LA CURVA DE GOLAY



Curva de Golay

La curva de *Golay* presenta un mínimo en el valor H (máxima eficiencia) y para el cual se puede obtener la velocidad lineal óptima de la fase móvil. La ecuación de Golay se puede escribir de la siguiente manera

$$H = \frac{B}{\mu} + (C_s + C_m) * \mu$$

Ecuación 1

El término de difusión longitudinal B/μ : inversamente proporcional a la velocidad lineal y está asociado al proceso en el cual el soluto se difunde desde una zona de mayor concentración (centro de la banda) hacia una zona de menor concentración delante y detrás de la banda causando un ensanchamiento.

El término de transferencia de masa C_s (fase estacionaria): Es directamente proporcional a la velocidad lineal y está asociado a la transferencia de masa de la fase estacionaria que es un sólido o un líquido polimerizado.

El término de transferencia de masa C_m (fase móvil): Es directamente proporcional a la velocidad lineal y está asociado a la transferencia de masa de la fase móvil que es un gas.

Para determinar la *Curva de Golay* se tuvo en cuenta los siguientes términos y fórmulas:

$$N = \frac{4tR}{Wb} \times \frac{4tR}{Wb}$$

Ecuación 2

$$\mu = \frac{L}{tM}$$

Ecuación 4

$$H = \frac{L}{N}$$

Ecuación 3

$$P_s = \frac{P_g}{P_s}$$

Ecuación 5

$$P_s = \frac{P_e}{P_s}$$

Ecuación 6

$$F_c = \frac{\mu \pi r^2 298^\circ K}{Tj}$$

Ecuación 7

$$j = 1,5 \left[\frac{(P_s^2 - 1)}{(P_s^3 - 1)} \right]$$

Ecuación 8

Donde el significado de cada término es:

- tR* Tiempo de retención del compuesto (min)
- tM* Tiempo de retención del disolvente (min)
- Wb* Ancho del pico cromatográfico (min)
- N* Número de platos teóricos
- L* Largo columna (cm)
- H* Altura de plato teórico (HETP)
- μ* Velocidad Lineal (cm/min)
- P_e* Presión absoluta a la entrada de la columna (atm)
- P_s* Presión a la salida de la columna (atm)
- j* Factor de corrección por efecto del cambio de presión
- T* Temperatura del horno (K)
- r* Radio de la columna (cm)
- F_c* Flujo de fase móvil a la salida de la columna

Resulta más práctico realizar el trabajo empleando una hoja electrónica en la cual se puede realizar la tabulación de los datos, el cálculo de los resultados y la gráfica a la vez.

Los cálculos necesarios para calcular el flujo óptimo se presentan en la revista Laboratorio de Análisis Instrumental del Profesor Jorge Castillo¹.

Para poder calcular el flujo óptimo se evaluó el comportamiento de la columna en los siguientes valores.

¹ CASTILLO J., Laboratorio de Análisis Instrumental; Septiembre 2008.

Rango de flujos

número flujo	Flujo (mL/min)
1	5,40
2	5,80
3	6,74
4	7,20
5	7,70
6	8,00

En la siguiente tabla se muestra la variación de la presión a medida que se cambia el flujo de la columna y también el tiempo que se demora.

Variación de la presión respecto al flujo

Presión (kPa)	Flujo (mL/min)	Tiempo de Análisis (min)
60	8,00	25,00
58	7,70	28,00
56	7,20	28,00
52	6,70	32,50
46	5,80	47,50
44	5,40	52,50

Se debe tabular los siguientes datos que se necesitan para determinar la curva

Datos para *Curva Golay*

FLUJO (mL/min)	5,40	5,80	6,74	7,20	7,70	8,00
LONGITUD COLUMNA (m)	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
RADIO COLUMNA (cm)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
T° HORNO (°C)	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Po (atm)	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
Pe (atm)	0,42	0,45	0,51	0,54	0,57	0,59
Ps (atm)	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59
Pe + Po (atm)	1,24	1,27	1,33	1,36	1,39	1,41

De cada cromatograma se tabula los siguientes datos en las columnas correspondientes.

Datos de flujo para *Curva Golay*

FLUJO (mL/min)	5,40	5,80	6,70	7,20	7,70	8,00
Po (atm)	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
tm (min)	7,23	6,82	6,11	5,80	5,49	5,30
tr (min)	23,69	23,11	22,03	21,9	21,66	21,37
Wb	1,46	1,40	0,82	1,14	1,13	1,26

Se calculan los términos N, H, μ , Po, j y Fc para cada cromatograma empleando las fórmulas indicadas. Es así como se obtiene la curva de Golay para el método creado.

ANEXO 6

DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y % RSD DE ALTURAS CONCENTRACIONES DE LOS CONGÉNERES

Datos de alturas para LOD

LOD	Altura (h ₁)	Altura (h ₂)	Altura (h ₃)	Media	Desvest*	D.E.R.
Acetaldehído	10,0	10,0	10,0	10,0	0,0	0,0
2 Metil Propanal	11,0	11,0	10,0	11,0	0,0	0,0
N Propanol	11,0	11,0	11,0	11,0	0,0	0,0
Acetato Etilo	10,0	11,0	11,0	10,7	0,5	4,4
Sec Butanol	12,0	12,0	12,0	12,0	0,0	0,0
Iso Butanol	11,0	10,0	11,0	10,7	0,5	4,4
Metil Isobutirato	11,0	10,0	10,0	10,3	0,5	4,6
N Butanol	9,0	10,0	9,0	9,3	0,5	5,1
Pentanal	11,0	10,0	10,0	10,3	0,5	4,6
Sec Butil Acetato	10,0	11,0	11,0	10,7	0,5	4,4
Alcohol Isoamílico	11,0	11,0	12,0	11,3	0,5	4,2
Alcohol N Amílico	9,0	10,0	10,0	9,7	0,5	4,9
Hexanal	10,0	10,0	10,0	10,0	0,0	0,0
3 Amil Acetato	9,0	9,0	10,0	9,3	0,5	5,1
Furfural	10,0	10,0	11,0	10,3	0,5	4,6
Heptanal	10,0	10,0	11,0	10,3	0,5	4,6

*desviación estándar

Resultados de Concentraciones obtenidas para LOD

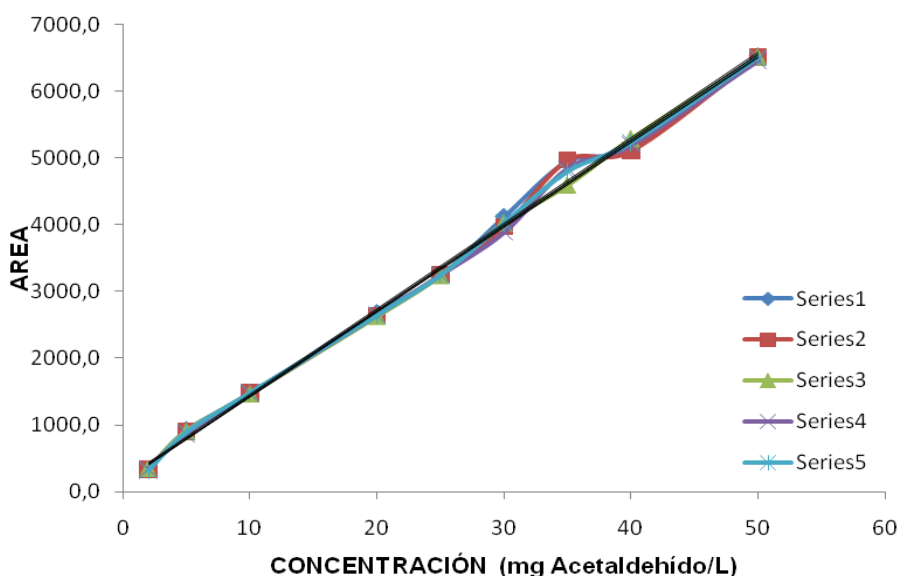
LOD	Media	Concentración	Concentración	Concentración	media
Acetaldehído	10,0	0,50	0,40	0,50	0,47
2 Metil Propanal	11,0	0,30	0,30	0,30	0,30
N Propanol	11,0	0,90	0,90	0,90	0,90
Acetato Etilo	10,7	0,70	0,70	0,70	0,70
Sec Butanol	12,0	0,90	0,90	0,90	0,90
Iso Butanol	10,7	0,90	0,90	0,90	0,90
Metil Isobutirato	10,3	0,90	0,90	0,90	0,90
N Butanol	9,3	0,90	0,90	0,90	0,90
Pentanal	10,3	0,80	0,80	0,80	0,80
Secbutil acetato	10,7	0,70	0,70	0,70	0,70

Isoamílico	11,3	0,90	0,90	0,90	0,90
N Amilico	9,7	0,90	0,90	0,90	0,90
Hexanal	10,0	0,80	0,80	0,80	0,80
3 Amil Acetato	9,3	0,52	0,52	0,52	0,52
Furfural	10,3	1,00	1,00	1,00	1,00
Heptanal	10,3	1,00	1,00	1,00	1,00

ANEXO 7

RESULTADOS DE LOS INTERCEPTOS Y PENDIENTES OBTENIDAS POR LAS ECUACIONES DE CURVAS DE CALIBRACIÓN (MÉTODO 1)

En el siguiente anexo se presenta solo una grafica obtenida de los niveles de concentración y las 5 áreas obtenidas por cada inyección realizada; para los demás congéneres se presentan los resultados de los interceptos y las pendientes en las tablas aclarando que se encontraron de la misma forma explicada anteriormente.



Curvas obtenidas para Acetaldehído

	Ecuaciones Acetaldehído
1	$y = 127,14x + 162,49$
2	$y = 127,68x + 159,25$
3	$y = 128,15x + 178,08$
4	$y = 127,17x + 150,51$
5	$y = 127,84x + 167,69$

Intercepto	Pendiente
162,49	127,14
159,25	127,68
178,08	128,15
150,51	127,17
157,69	127,84

media intercepto	161,6
Desviación estándar Intercepto	10,2
media pendiente	127,6
Desviación estándar pendiente	0,4

	Ecuaciones 2 Metil propanal
1	$y = 98,40 + 145,4$
2	$y = 99,31 + 119,2$
3	$y = 98,15 + 138,9$
4	$y = 97,83 + 145,4$
5	$y = 97,87 + 159,2$

Intercepto	Pendiente
145,4	98,4
119,2	99,31
138,9	98,15
145,4	97,83
159,2	97,87

media intercepto	141,66
Desviación estándar Intercepto	14,55
media pendiente	98,32
Desviación estándar pendiente	0,60

	Ecuaciones n propanol
1	$y = 224,7x - 106,7$
2	$y = 221,1x - 25,69$
3	$y = 221,5x - 57,57$
4	$y = 222,8x - 67,50$
5	$y = 224,3x - 129,1$

Intercepto	Pendiente
106,7	224,7
25,69	221,1
57,57	221,5
67,5	222,8
129,1	224,3

media intercepto	77,3
Desviación estándar Intercepto	40,9
media pendiente	222,9
Desviación estándar pendiente	1,6

	Ecuaciones acetato etilo
1	$y = 150,9x + 103,1$
2	$y = 151,4x + 119,2$
3	$y = 150,5x + 102,6$
4	$y = 150,8x + 103,2$
5	$y = 151,2x + 108,8$

Intercepto	Pendiente
103,1	150,9
119,2	151,4
102,6	150,5
103,2	150,8
108,8	151,2

media intercepto	109,3
Desviación estándar Intercepto	11,0
media pendiente	151,0
Desviación estándar pendiente	0,3

	Ecuaciones Sec butanol
1	$y = 260,58x + 127,02$
2	$y = 258,69 + 129,36$
3	$y = 257,01 + 182,64$
4	$y = 259,7 + 148,72$
5	$y = 258,24 + 137,85$

Intercepto	Pendiente
127,02	260,58
129,36	258,69
182,64	257,01
148,72	259,7
137,85	258,24

media intercepto	145,13
Desviación estándar Intercepto	22,64
media pendiente	258,84
Desviación estándar pendiente	1,37

	Ecuaciones Iso butanol
1	$y = 273,09x + 117,38$
2	$y = 269,07 + 168,85$
3	$y = 270,41 + 156,21$
4	$y = 273,27 + 106,36$
5	$y = 271,71 + 126,3$

Intercepto	Pendiente
117,38	273,09
168,85	269,07
156,21	270,41
106,36	273,27
126,3	271,71

media intercepto	135,02
Desviación estándar Intercepto	26,47
media pendiente	271,51
Desviación estándar pendiente	1,79

	Ecuaciones Metil Isobutirato
1	$y = 181,07x + 57,40$
2	$y = 179,36 + 93,92$
3	$y = 179,80 + 92,38$
4	$y = 179,85 + 105,22$
5	$y = 178,840 + 74,47$

Intercepto	Pendiente
57,405	181,07
93,925	179,36
92,38	179,8
105,22	179,85
74,47	178,84

media intercepto	84,68
Desviación estándar Intercepto	18,81
media pendiente	179,78
Desviación estándar pendiente	0,83

	Ecuaciones n butanol
1	$y = 263,1x + 117,7$
2	$y = 251,76 + 265,46$
3	$y = 261,55 + 78,748$
4	$y = 263,05 + 116,85$
5	$y = 259,78 + 100,12$

Intercepto	Pendiente
117,7	263,1
265,46	251,76
78,748	261,55
116,85	263,05
100,12	259,78

media intercepto	135,78
Desviación estándar Intercepto	74,21
media pendiente	259,83
Desviación estándar pendiente	4,72

	Ecuaciones Pentanal
1	$y = 148,3x - 165,23$
2	$y = 150,75x - 204,86$
3	$y = 151,86x - 213,25$
4	$y = 152,2x - 201,63$
5	$y = 148,84x - 150,4$

Intercepto	Pendiente
165,23	148,3
204,86	150,75
213,25	151,86
201,63	152,2
150,4	148,84

media intercepto	187,07
Desviación estándar Intercepto	27,55
media pendiente	150,70
Desviación estándar pendiente	1,54

	Ecuaciones Sec Butil acetato
1	$y = 244,5x + 577,71$
2	$y = 250,85x + 444,4$
3	$y = 245,54x + 554,47$
4	$y = 246,12x + 573,56$
5	$y = 245,46x + 553,32$

Intercepto	Pendiente
577,71	244,5
444,4	250,85
554,47	245,54
573,56	246,12
553,36	245,46

media intercepto	540,70
Desviación estándar Intercepto	54,92
media pendiente	246,49
Desviación estándar pendiente	2,50

	Ecuaciones Iso amílico
1	$y = 545,9x + 382,41$
2	$y = 545,21x + 378,18$
3	$y = 538,29x + 499,57$
4	$y = 544,77x + 460,05$
5	$y = 539,27x + 513,89$

Intercepto	Pendiente
382,41	545,9
378,18	545,21
499,57	538,29
460,05	544,77
513,89	539,27

media intercepto	446,91
Desviación estándar Intercepto	63,89
media pendiente	542,69

Desviación estándar pendiente	3,61
-------------------------------	------

	Ecuaciones N amílico
1	$y = 500,68x + 304,11$
2	$y = 496,35x + 351,98$
3	$y = 505x + 239,35$
4	$y = 500,03x + 339,24$
5	$y = 495,98x + 365,65$

Intercepto	Pendiente
304,11	500,68
351,98	496,35
239,35	505,00
339,24	500,03
365,65	495,98

media intercepto	320,07
Desviación estándar Intercepto	50,58
media pendiente	499,61
Desviación estándar pendiente	3,68

	Ecuaciones Hexanal
1	$y = 305,88x + 74,548$
2	$y = 305,65x + 82,022$
3	$y = 305,26x + 96,62$
4	$y = 305,8x + 116,34$
5	$y = 306,14x + 91,372$

Intercepto	Pendiente
74,548	305,88
82,022	305,65
96,62	305,26
116,34	305,80
91,372	306,14

media intercepto	92,18
Desviación estándar Intercepto	15,95
media pendiente	305,75
Desviación estándar pendiente	0,32

	Ecuaciones 3 Amil acetato
1	$y = 317,18x - 35,672$
2	$y = 321,02x - 63,786$
3	$y = 317,56x - 0,3196$
4	$y = 314,98x - 19,686$
5	$y = 321,68x - 96,127$

Intercepto	Pendiente
35,672	317,18
63,786	321,02
0,3196	317,56
19,686	314,98
96,127	321,68

media intercepto	43,12
Desviación estándar Intercepto	37,66
media pendiente	318,48

Desviación estándar pendiente	2,81
-------------------------------	------

	Ecuaciones Furfural
1	$y = 318,6x + 462,02$
2	$y = 327,04x + 328,92$
3	$y = 323,38x + 400,48$
4	$y = 326,63x + 368,73$
5	$y = 325,83x + 349,54$

Intercepto	Pendiente
462,02	318,60
328,92	327,04
400,48	323,38
368,73	326,63
349,54	325,83

media intercepto	384,49
Desviación estándar Intercepto	52,42
media pendiente	324,30
Desviación estándar pendiente	3,49

	Ecuaciones Heptanal
1	$y = 203,97x + 68,741$
2	$y = 203,16x + 114,48$
3	$y = 202,99x + 127,95$
4	$y = 205,53x + 59,231$
5	$y = 203,57x + 98,602$

Intercepto	Pendiente
68,741	203,97
114,48	203,16
127,95	202,99
59,231	205,53
98,602	203,57

media intercepto	93,80
Desviación estándar Intercepto	29,32
media pendiente	203,84
Desviación estándar pendiente	1,01

ANEXO 8

CÁLCULOS PARA DETERMINAR EL LOD y LOQ DE LOS CONGÉNERES

Ecuación pertinente para el LOD

$$LOD = \frac{3 * s \text{ intercepto}}{\text{promedio pendiente}}$$

Donde s es la desviación estándar del intercepto.

Resultados de LOD para los congéneres

Compuesto	s intercepto	Pendiente Promedio	LOD
acetaldehído	10,20	127,60	0,2
2 metil propanal	14,55	98,32	0,4
N propanol	40,94	222,92	0,6
Acetato de etilo	11,03	150,99	0,2
Sec butanol	22,64	258,84	0,3
Iso butanol	26,47	271,51	0,3
Metil Isobutirato	18,81	179,78	0,3
N butanol	74,21	259,83	0,9
Pentanal	27,55	150,70	0,5
Sec Butil acetato	54,92	245,46	0,7
Alcohol Iso – amílico	63,89	542,69	0,4
Alcohol n – amílico	50,58	499,61	0,1
Hexanal	15,95	305,75	0,1
3 Amil acetato	37,66	318,48	0,3
Furfural	52,42	324,30	0,4
Heptanal	29,33	203,84	0,4

Continuación Anexo 8

CÁLCULOS PARA DETERMINAR EL LOQ DE LOS CONGÉNERES

Ecuación pertinente para LOQ

$$LOQ = \frac{10 * s \text{ intercepto}}{\text{promedio pendiente}}$$

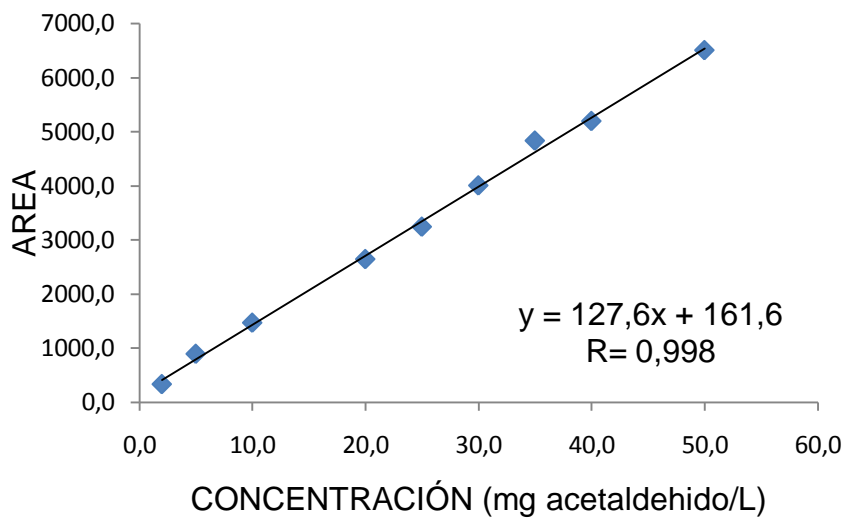
Donde s es la desviación estándar del intercepto.

Resultados de LOQ para los congéneres

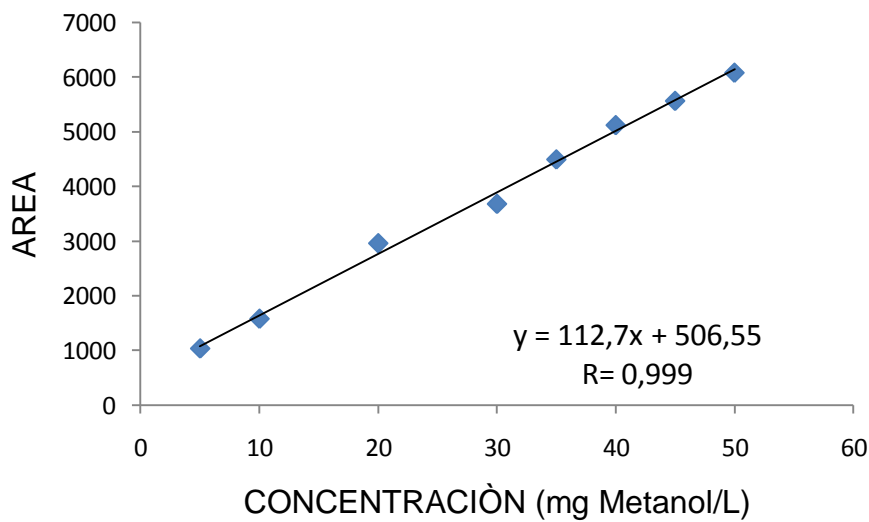
Compuesto	s intercepto	Promedio Pendiente	LOQ
acetaldehído	10,20	161,60	0,8
2 metil propanal	14,55	98,32	1,5
n propanol	40,90	222,90	1,8
Acetato de etilo	11,00	151,00	0,7
Sec butanol	22,64	258,84	0,9
Iso butanol	26,47	271,51	1,0
Metil Isobutirato	18,10	179,78	1,0
N butanol	74,21	259,83	2,9
Pentanal	27,55	150,70	1,8
Sec Butil acetato	54,92	246,49	2,2
Alcohol Iso – amílico	63,89	542,69	1,2
Alcohol n – amílico	50,58	499,61	1,0
Hexanal	15,95	305,75	0,5
3 Amil acetato	37,66	318,48	1,2
Furfural	52,42	324,30	1,6
Heptanal	29,32	203,84	1,4

ANEXO 9

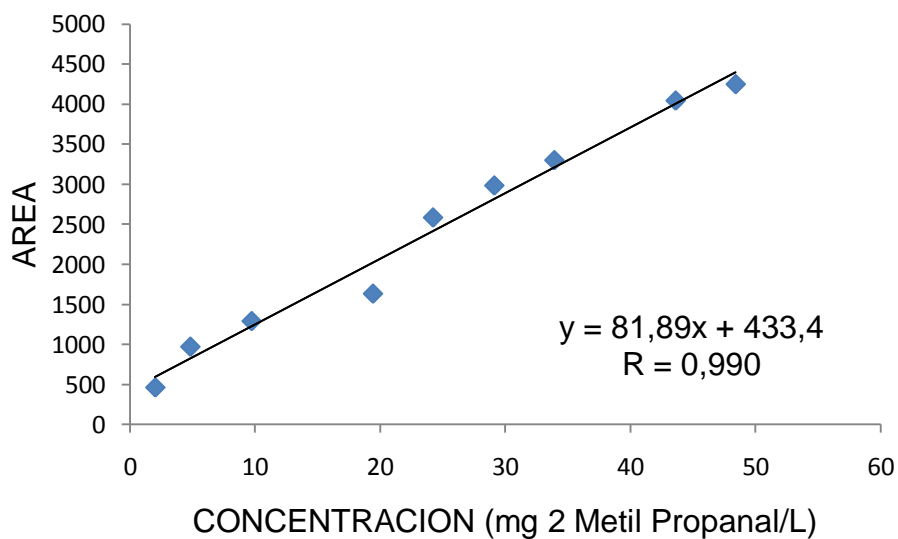
INTERVALO LINEAL, CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS CONGÉNERES



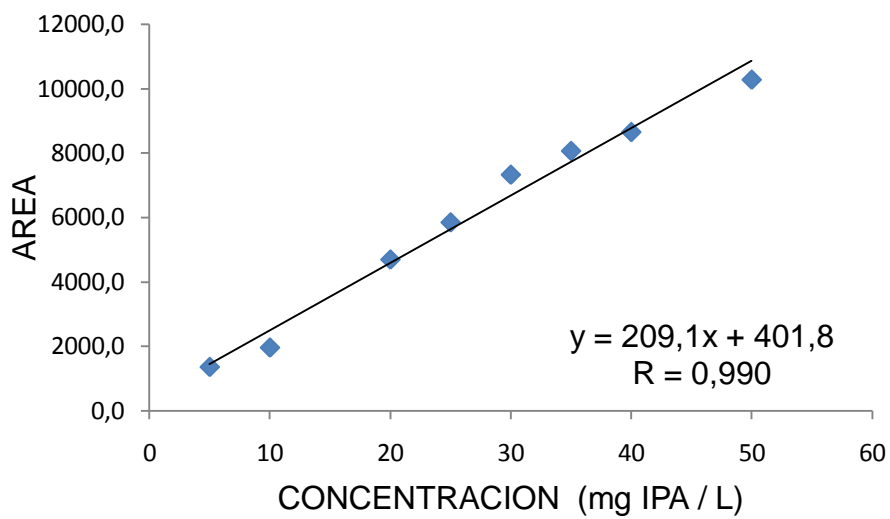
Curva Calibración Acetaldehído



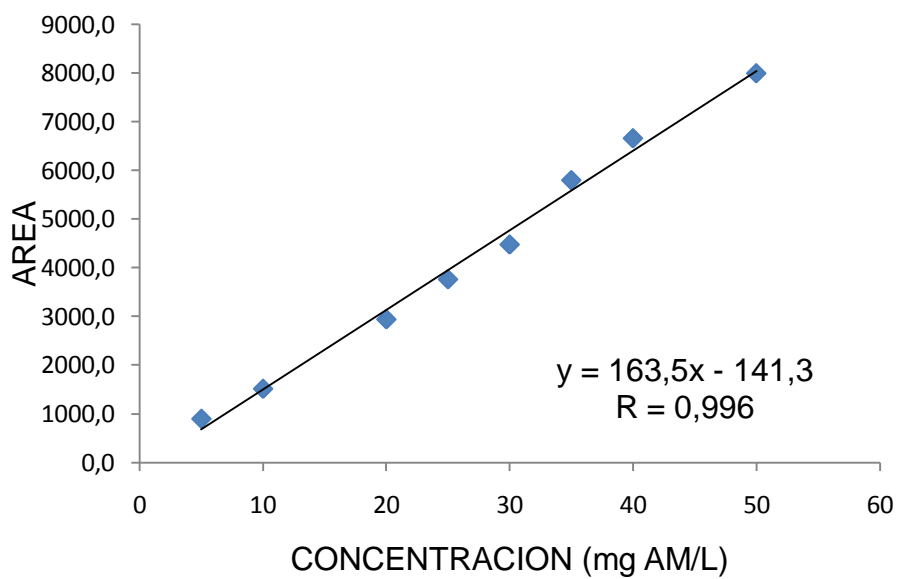
Curva Calibración Metanol



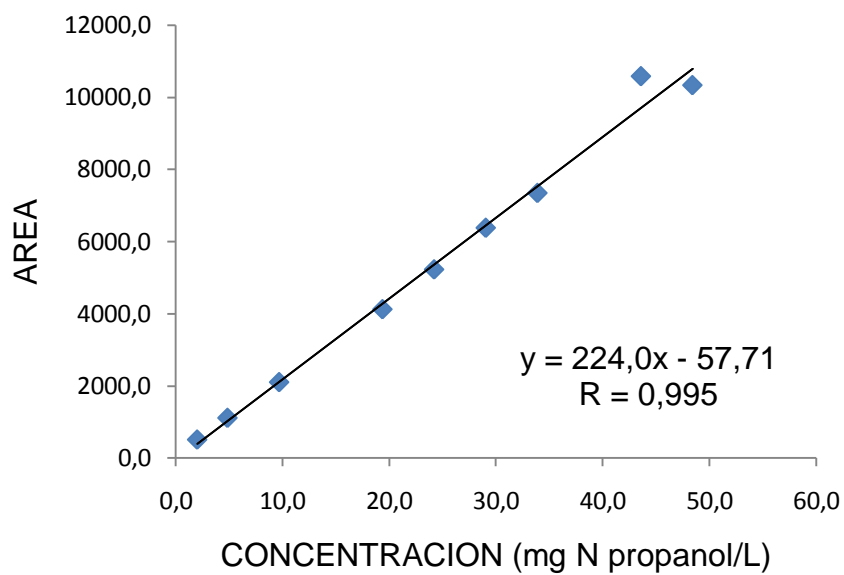
Curva Calibración 2 Metil Propanal



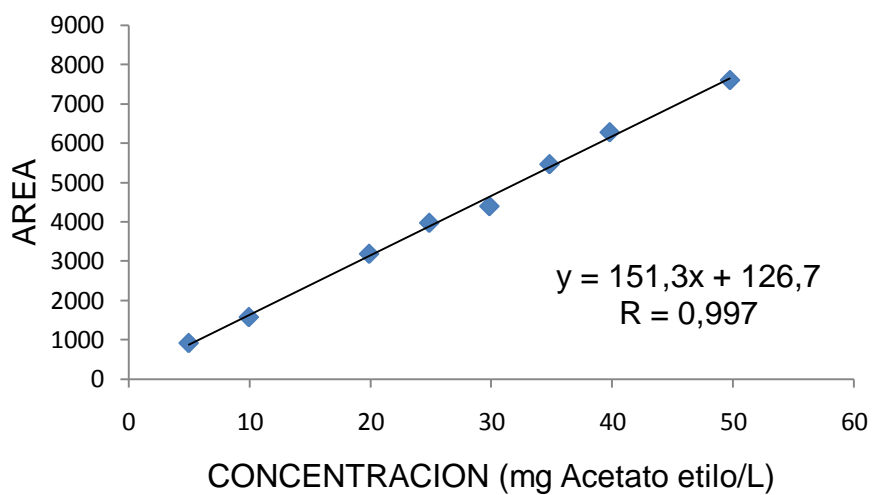
Curva Calibración IPA



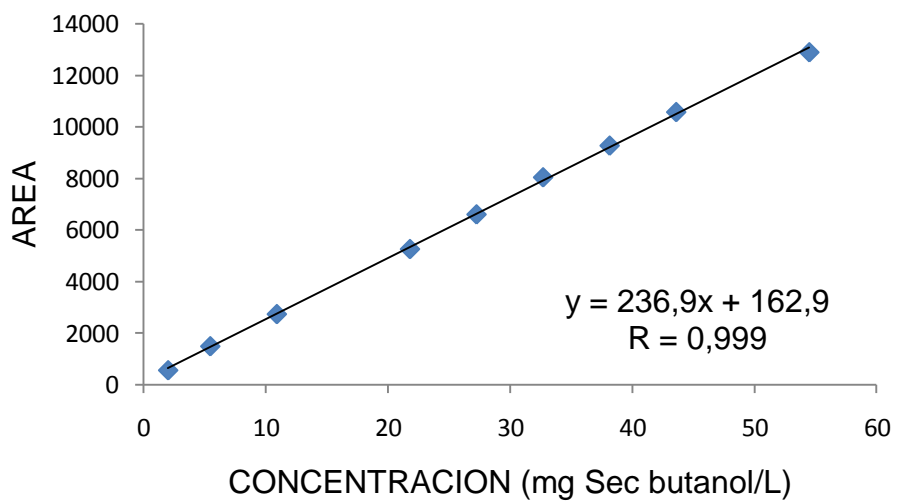
Curva Calibración AM



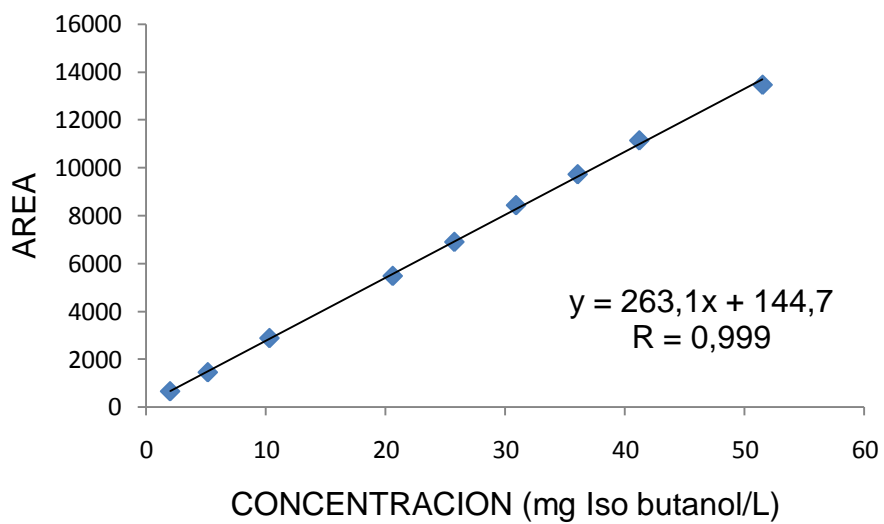
Curva Calibración N Propanol



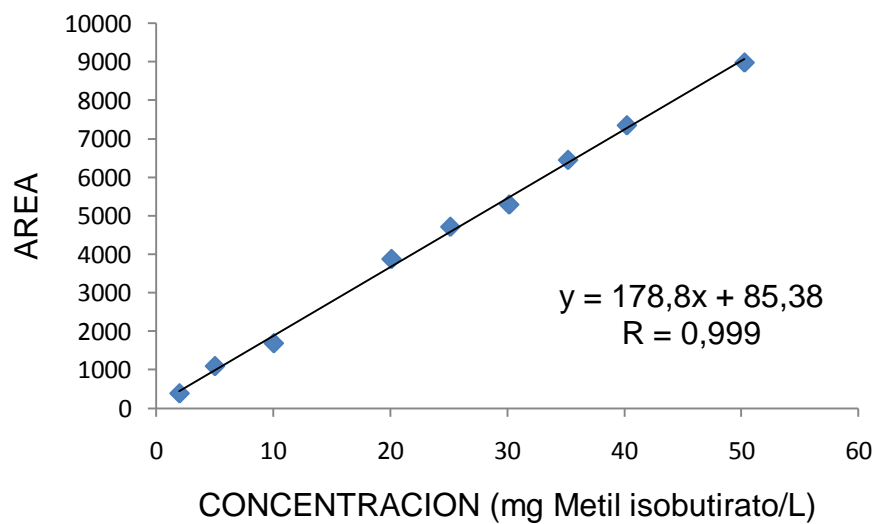
Curva Calibración Acetato de Etilo



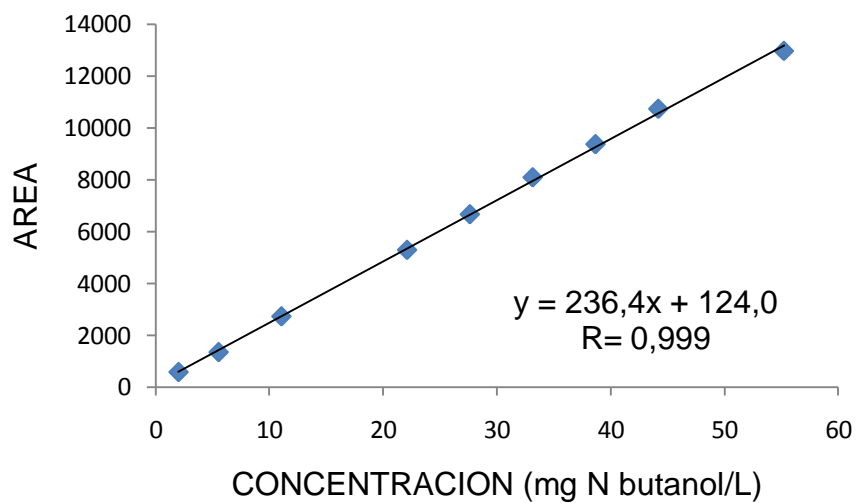
Curva Calibración Sec Butanol



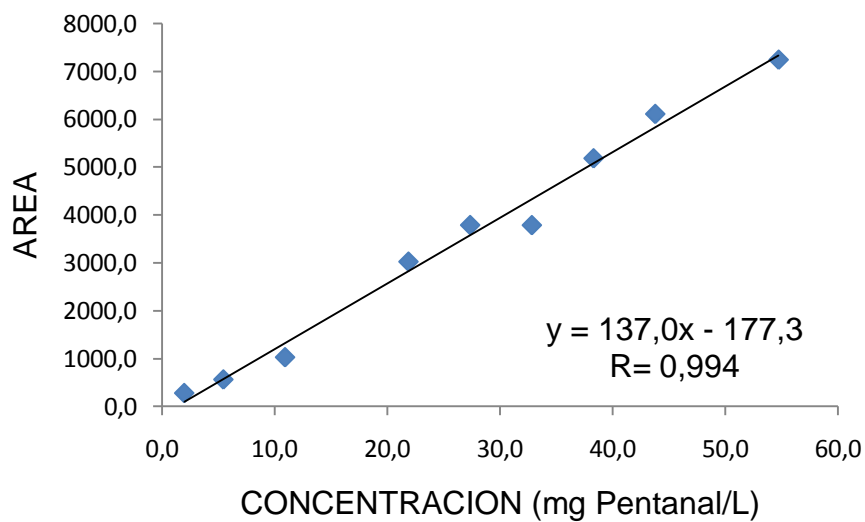
Curva Calibración Iso Butanol



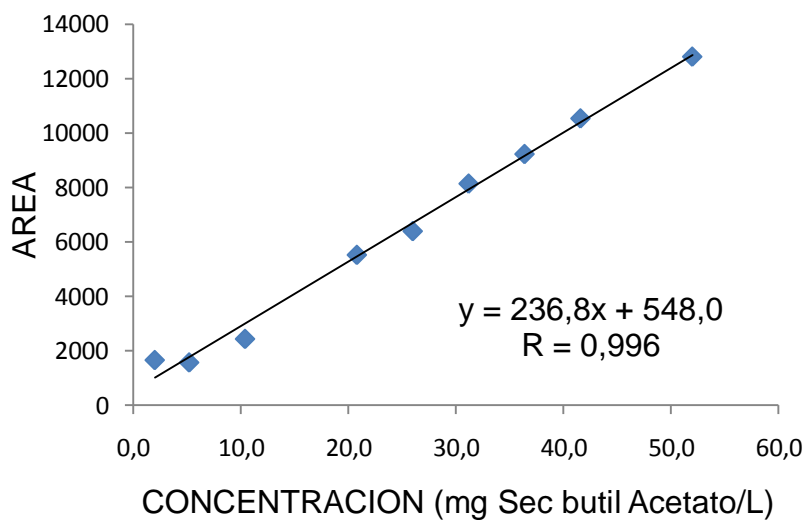
Curva Calibración Metil Isobutirato



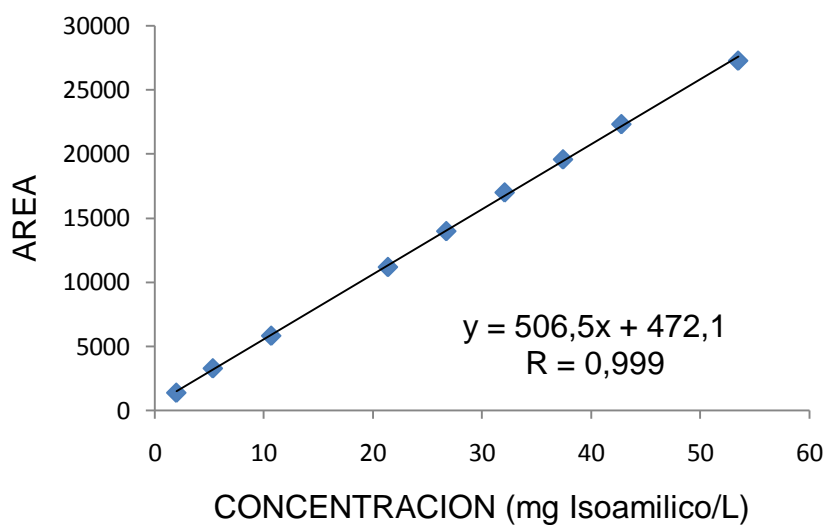
Curva Calibración N Butanol



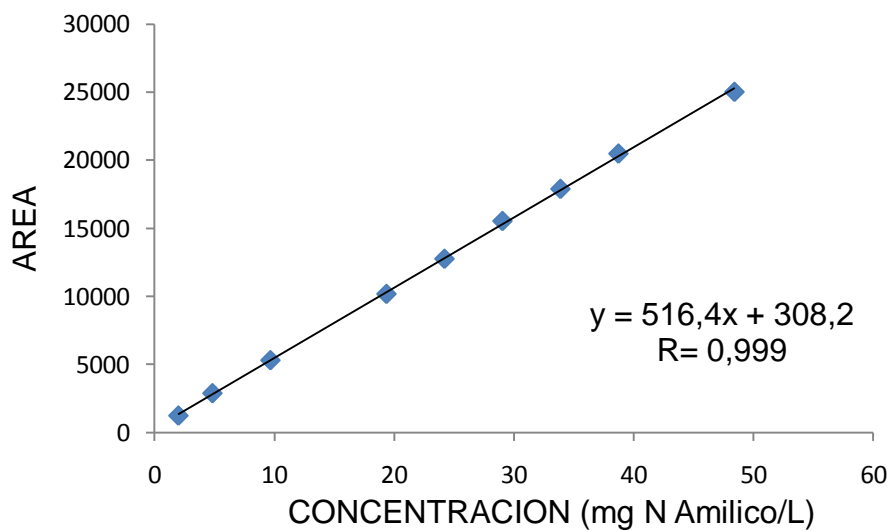
Curva Calibración Pentanal



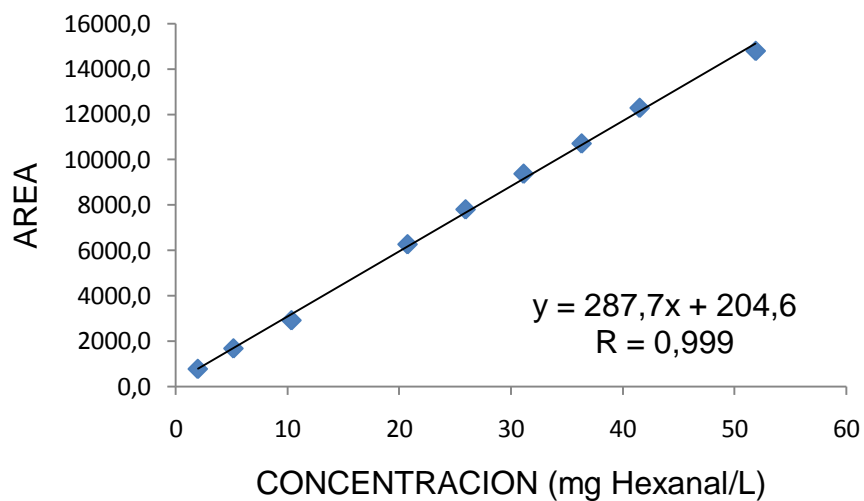
Curva Calibración Sec Butil Acetato



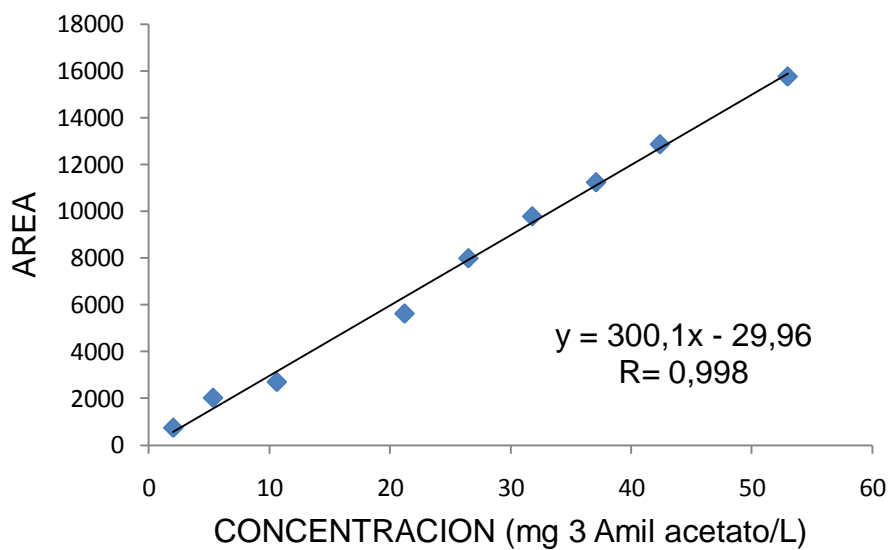
Curva Calibración Alcohol Isoamílico



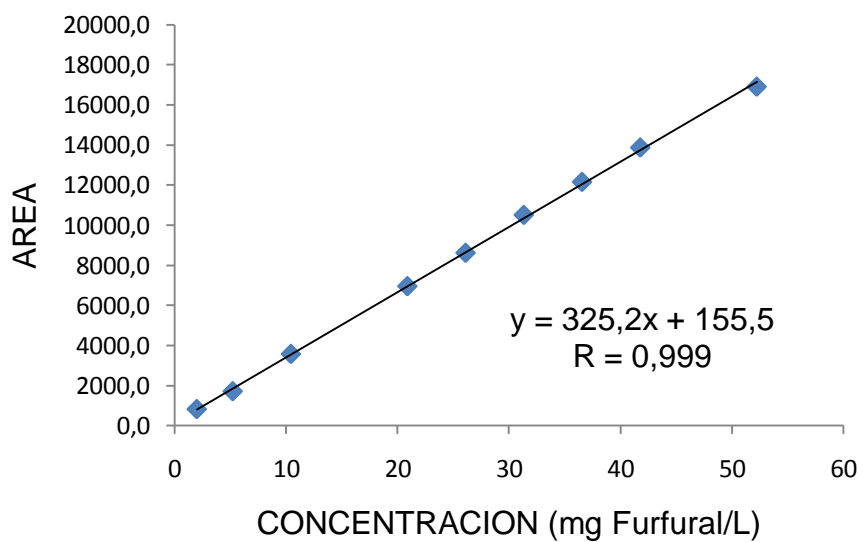
Curva Calibración Alcohol N - Amilico



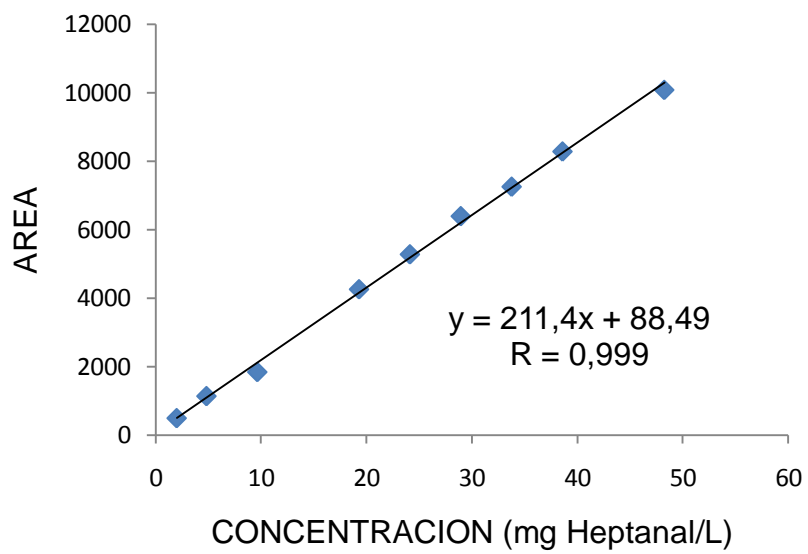
Curva Calibración Hexanal



Curva Calibración 3 Amil Acetato



Curva Calibración Furfural



Curva Calibración Heptanal

ANEXO 10

CÁLCULO DE ESTADÍSTICO SHAPIRO WILK PARA CADA NIVEL DE LA CURVA DE CALIBRACION DE LOS 19 CONGÉNERES PARA REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los congéneres donde aparece el W calculado para cada nivel de concentración realizado por SPSS. El W tabulado para la repetibilidad es 0,986 y precisión intermedia es 0,979

Estadístico Shapiro Wilk para Acetaldehído

Concentración Acetaldehído (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,958	0,875
5	0,928	0,983
10	0,882	0,929
20	0,900	0,939
25	0,676	0,976
30	0,973	0,920
35	0,906	0,973
40	0,991	0,964
50	0,824	0,841

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para 2 Metil propanal

Concentración 2 Metil propanal (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,982	0,923
5	0,863	0,903
10	0,856	0,932
20	0,894	0,624
25	0,939	0,862
30	0,752	0,637
35	0,913	0,912

40	0,961	0,811
50	0,996	0,974

gl grados de libertad= 5 gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para n propanol

Concentración n propanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,955	0,933
5	0,805	0,812
10	0,981	0,950
20	0,757	0,923
25	0,989	0,884
30	0,942	0,875
35	0,847	0,933
40	0,940	0,882
50	0,968	0,806

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Acetato de Etilo

Concentración acetato etilo (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,849	0,903
5	0,984	0,863
10	0,786	0,900
20	0,784	0,959
25	0,920	0,980
30	0,909	0,935
35	0,850	0,961
40	0,992	0,904
50	0,714	0,930

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Iso Butanol

Concentración Iso butanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,988	0,951
5	0,771	0,944
10	0,895	0,830
20	0,985	0,951
25	0,866	0,926
30	0,938	0,843
35	0,856	0,967
40	0,970	0,933
50	0,720	0,851

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Sec Butanol

Concentración Sec butanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,909	0,914
5	0,932	0,810
10	0,940	0,941
20	0,973	0,939
25	0,849	0,965
30	0,810	0,902
35	0,836	0,882
40	0,734	0,900
50	0,897	0,882

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Metil Isobutirato

Concentración Metil Isobutirato (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (w) Calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,799	0,990
5	0,948	0,870
10	0,895	0,863
20	0,839	0,918
25	0,973	0,911
30	0,775	0,966
35	0,962	0,940
40	0,898	0,514
50	0,898	0,928

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para N Butanol

Concentración N butanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,913	0,895
5	0,954	0,915
10	0,879	0,976
20	0,987	0,955
25	0,947	0,925
30	0,840	0,898
35	0,937	0,961
40	0,911	0,909
50	0,909	0,881

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Pentanal

Concentración Pentanal (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA

2	0,883	0,916
5	0,935	0,977
10	0,950	0,968
20	0,863	0,867
25	0,885	0,935
30	0,886	0,822
35	0,957	0,955
40	0,914	0,961
50	0,947	0,954

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Sec butil acetato

Concentración Sec butil Acetato (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,921	0,851
5	0,920	0,899
10	0,749	0,927
20	0,934	0,913
25	0,935	0,906
30	0,910	0,963
35	0,857	0,907
40	0,853	0,958
50	0,853	0,968

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Alcohol isoamílico

Concentración Isoamílico (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,851	0,880
5	0,991	0,902
10	0,940	0,918
20	0,842	0,954
25	0,927	0,922

30	0,970	0,891
35	0,902	0,946
40	0,949	0,378
50	0,877	0,558

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Alcohol N Amílico

Concentración n amílico (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,749	0,992
5	0,817	0,854
10	0,781	0,940
20	0,766	0,991
25	0,924	0,924
30	0,708	0,852
35	0,853	0,935
40	0,821	0,961
50	0,902	0,960

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Hexanal

Concentración Hexanal (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,794	0,925
5	0,788	0,864
10	0,838	0,931
20	0,927	0,952
25	0,979	0,829
30	0,924	0,969
35	0,957	0,948
40	0,807	0,932
50	0,554	0,911

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para 3 amil acetato

Concentración 3 amil acetato (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,991	0,985
5	0,878	0,877
10	0,757	0,845
20	0,827	0,916
25	0,692	0,927
30	0,687	0,830
35	0,974	0,963
40	0,958	0,881
50	0,963	0,918

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Furfural

Concentración furfural (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
2	0,786	0,673
5	0,906	0,916
10	0,910	0,901
20	0,654	0,951
25	0,968	0,901
30	0,863	0,834
35	0,981	0,885
40	0,939	0,927
50	0,902	0,855

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

Estadístico Shapiro Wilk para Heptanal

Concentración heptanal (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA

2	0,979	0,936
5	0,971	0,928
10	0,978	0,927
20	0,943	0,884
25	0,928	0,911
30	0,775	0,900
35	0,905	0,954
40	0,927	0,905
50	0,757	0,897

gl grados de libertad= 5

gl grados de libertad= 12

ANEXO 11

CÁLCULO DE ESTADÍSTICO DE LEVENE PARA CONGÉNERES PARA REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los congéneres donde aparece el estadístico (W) calculado de Levene para cada nivel de concentración realizado por SPSS

Estadístico de Levene para Acetaldehído

Acetaldehído	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $_{(10,50)} = 5.9$		
basándose en la media	4,567	8	36
basándose en la mediana	3,645	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $_{(10,100)} = 5.0$		
basándose en la media	4.765	8	99
basándose en la mediana	2.098	8	99

Estadístico de Levene para 2 Metil propanal

2 Metil propanal	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $_{(10,50)} = 5.9$		
basándose en la media	3,042	8	36
basándose en la mediana	1,570	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $_{(10,100)} = 5.0$		
basándose en la media	11,285	8	99
basándose en la mediana	3,475	8	99

Estadístico de Levene para n propanol

N propanol	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $_{(10,50)} = 5.9$		
basándose en la media	2,937	8	36
basándose en la mediana	2,110	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $_{(10,100)} = 5.0$		
basándose en la media	8,679	8	99
basándose en la mediana	7,062	8	99

Estadístico de Levene para acetato de etilo

Acetato de etilo	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	3,538	8	36
basándose en la mediana	1,268	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	6,583	8	99
basándose en la mediana	6,185	8	99

Estadístico de Levene para Sec butanol

Sec butanol	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	3,938	8	36
basándose en la mediana	1,245	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	7,629	8	99
basándose en la mediana	6,876	8	99

Estadístico de Levene para Iso butanol

Iso butanol	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	6,386	8	36
Iso butanol	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
basándose en la mediana	1,096	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	11,706	8	99
basándose en la mediana	5,262	8	99

Estadístico de Levene para Metil Isobutirato

Metil Isobutirato	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	2,246	8	36
basándose en la mediana	1,169	8	36

PRECISION INTERMEDIA	W tabulado _(10,100) = 5.0		
basándose en la media	3,600	8	99
basándose en la mediana	2,075	8	99

Estadístico de Levene para n butanol

N butanol	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado _(10,50) = 5.9		
basándose en la media	4,027	8	36
basándose en la mediana	1,340	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado _(10,100) = 5.0		
basándose en la media	12,645	8	99
basándose en la mediana	11,166	8	99

Estadístico de Levene para Pentanal

Pentanal	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado _(10,50) = 5.9		
basándose en la media	5,213	8	36
basándose en la mediana	2,937	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado _(10,100) = 5.0		
basándose en la media	6,294	8	99
basándose en la mediana	5,055	8	99

Estadístico de Levene para Sec Butil acetato

Sec Butil Acetato	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado _(10,50) = 5.9		
basándose en la media	2,495	8	36
basándose en la mediana	1,236	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado _(10,100) = 5.0		
basándose en la media	7,160	8	99
basándose en la mediana	6,691	8	99

Estadístico de Levene para Alcohol Isoamílico

Isoamílico	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	6,096	8	36
basándose en la mediana	2,904	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	3,286	8	99
basándose en la mediana	1,288	8	99

Estadístico de Levene para alcohol N amílico

N amílico	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	5,304	8	36
basándose en la mediana	3,622	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	31,268	8	99
basándose en la mediana	18,312	8	99

Estadístico de Levene para Hexanal

Hexanal	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	7,098	8	36
basándose en la mediana	1,007	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	8,354	8	99
basándose en la mediana	7,318	8	99

Estadístico de Levene para 3 Amil Acetato

3 amil acetato	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	2,400	8	36
basándose en la mediana	0,615	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		

basándose en la media	11,258	8	99
basándose en la mediana	9,592	8	99

Estadístico de Levene para Furfural

Furfural	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	7,671	8	36
basándose en la mediana	1,898	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	26,856	8	99
basándose en la mediana	24,617	8	99

Estadístico de Levene para Heptanal

Heptanal	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $(10,50) = 5.9$		
basándose en la media	1,846	8	36
basándose en la mediana	0,616	8	36
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $(10,100) = 5.0$		
basándose en la media	9,298	8	99
basándose en la mediana	7,828	8	99

ANEXO 12

CÁLCULO DE COEFICIENTE CORRELACION DE PEARSON PARA REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA

Coeficiente Correlacion Pearson para Acetaldehído

Acetaldehído	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,997
N	45,000	108,000

N: número de muestras

El segundo recuadro muestra un resumen del modelo de Regresión Lineal, con el Coeficiente de Regresión (**R**) y el Coeficiente de Determinación (**R²**)

Resumen de Modelo para Acetaldehído

Acetaldehído	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,998	0,996	0,995
Precisión intermedia	1	0,997	0,995	0,995

Anova de un factor Acetaldehído

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	34954018,11	1	34954018,11	2980,51
residual	82092,693	7	11727,528	
TOTAL	35036110,8	8		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	422312561,224	1	422312561,224	20626,357
residual	2170287,776	106	20474,413	
TOTAL	424482849,000	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$, con $t_{(0,05; 8)} = 1,859$ para repetibilidad y $t_{(0,05; 107)} = 1,600$ para precisión intermedia

Acetaldehído	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza
--------------	-----------------------------	------------------------

Repetibilidad	227,78	204,842	208,502
Precisión intermedia	143,619	126,265	129,800

Coeficiente Correlación Pearson para 2 metil propanal

2 Metil Propanal	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	1,000	0,998
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para 2 metil Propanal

2 Metil Propanal	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,904	0,818	0,813
Precisión Intermedia	1	0,929	0,864	0,863

Anova de un factor para 2 metil propanal

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
Regresión	259671552,263	1	259671552,263	192,731
Residual	57934926,048	7		
Total	317606478,311	8	1347323,862	
Precisión intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
Regresión	163670426,037	1	163670426,037	675,927
Residual	25667052,038	106	242142,000	
Total	189337478,074	107		

2 Metil propanal	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	13,883	132,939	178,127
Precisión intermedia	25,999	73,628	85,784

Coeficiente Correlación Pearson para N propanol

n propanol	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,998
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para N propanol

N propanol	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,999	0,998	0,998
Precisión Intermedia	1	0,998	0,997	0,997

Anova de un factor para N propanol

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	458502890,161	1	458502890,161	51887,534
residual	379968,417	43	8836,475	
TOTAL	458882858,578	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1008910189,122	1	1008910189,122	33376,499
residual	3294869,581	106	30228,161	
TOTAL	1012205058,703	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

N propanol	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	227,788	204,842	208,502
Precisión intermedia	183,471	193,607	197,837

Coefficiente Correlación Pearson para Acetato de Etilo

Acetato de Etilo	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,995
N	45,000	108

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Acetato de Etilo

Acetato de Etilo	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,998	0,997	0,997
Precisión Intermedia	1	0,995	0,990	0,990

Anova de un factor para Acetato de Etilo

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1008910189,122	1	1008910189,122	33376,499
residual	3294869,581	43	30228,161	
TOTAL		44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	424307616	1	424307616	11381,469
residual	3951740,01	106	37280,566	
TOTAL	428259356	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Acetato de Etilo	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	137,138	148,773	153,214
Precisión intermedia	106,683969	125,950012	130,719924

Coefficiente Correlación Pearson para Sec Butanol

Sec Butanol	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,999
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Sec Butanol

Sec Butanol	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,999	0,999	0,999
Precisión Intermedia	1	0,999	0,997	0,997

Anova de un factor para Sec Butanol

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	719210511,874	1	719210511,874	61110,549
residual	506067,326	43	11769,008	
TOTAL	719716579,200	44		

Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1532572489,929	1	1532572489,929	40385,795
residual	4022520,368	106	37948,305	
TOTAL	1536595010,296	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Sec Butanol	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	247,205	256,732	260,956
Precisión intermedia	200,962	241,495	246,308

Coefficiente Correlación Pearson para Iso Butanol

Iso Butanol	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,999	0,998
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Iso Butanol

Iso Butanol	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	1,000	0,999	0,999
Precisión Intermedia	1	0,998	0,997	0,997

Anova de un factor para Iso Butanol

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	791311276,329	1	791311276,329	46282,156
residual	735194,471	43	17097,546	
TOTAL	792046470,800	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1666587838,766	1	1666587838,766	47624,449
residual	3709403,753	106	34994,375	
TOTAL	1670297242,519	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Iso Butanol	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	215,133	268,964	274,054
Precisión intermedia	218,230	252,032	256,653

Coeficiente Correlación Pearson para Metil Isobutirato

Metil Isobutirato	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,999	0,994
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Metil Isobutirato

Metil Isobutirato	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,999	0,997	0,997
Precisión Intermedia	1	0,994	0,988	0,988

Anova de un factor para Metil Isobutirato

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	346960821,990	1	346960821,990	15494,483
residual	962879,210	43	22392,540	
TOTAL	347923701,200	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	633495362,790	1	633495362,790	9138,720
residual	7347911,979	106	69319,924	
TOTAL	640843274,769	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Metil Isobutirato	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	124,477	176,871	182,696
Precisión intermedia	95,597	153,559	160,063

Coeficiente Correlación Pearson para N Butanol

N Butanol	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,999
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para N Butanol

N Butanol	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,999	0,998	0,997
Precisión Intermedia	1	0,999	0,996	0,996

Anova de un factor para N Butanol

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	737282209,844	1	737282209,844	40045,529
residual	791677,267	43	18411,099	
TOTAL	738073887,111	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1562015141,145	1	1562015141,145	30964,035
residual	5347287,772	106	50446,111	
TOTAL	1567362428,917	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

N Butanol	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	200,114	259,435	264,717
Precisión intermedia	175,966	243,459	249,008

Coeficiente Correlación Pearson para Pentanal

Pentanal	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,993	0,996
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Pentanal

Pentanal	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,993	0,986	0,985
Precisión Intermedia	1	0,996	0,992	0,992

Anova de un factor para Pentanal

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	242928232,255	1	242928232,255	2928,584
residual	3566882,545	43	82950,757	
TOTAL	246495114,800	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	453097157,346	1	453097157,346	13200,655
residual	3638326,907	106	34323,839	
TOTAL	456735484,252	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Pentanal	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	54,116	144,829	156,041
Precisión intermedia	114,894	130,329	134,906

Coeficiente Correlación Pearson para Sec Butil Acetato

Sec Butil Acetato	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,996	0,960
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Sec Butil Acetato

Sec Butil Acetato	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,996	0,992	0,992
Precisión Intermedia	1	0,960	0,921	0,921

Anova de un factor para Sec Butil Acetato

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	650038070,608	1	650038070,608	5283,362
residual	5290501,970	43	123034,930	
TOTAL	655328572,578	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	916490169,555	1	916490169,555	1243,344
residual	78134447,853	106	737117,433	
TOTAL	994624617,407	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Sec Butil Acetato	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	72,687	239,254	252,909
Precisión intermedia	35,261	178,007	199,217

Coefficiente Correlación Pearson para Alcohol Isoamílico

Alcohol Isoamílico	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,999	0,996
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Alcohol Isoamílico

Alcohol Isoamílico	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	1,000	0,999	0,999
Precisión Intermedia	1	0,996	0,991	0,991

Anova de un factor para Alcohol Isoamílico

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	3161399416,951	1	3161399416,951	70415,782
residual	1930535,627	43	44896,177	
TOTAL	3163329952,578	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	6513027330,847	1	6513027330,847	12239,263
residual	56407065,477	106	532142,127	

TOTAL	6569434396,324	107		
-------	----------------	-----	--	--

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Alcohol Isoamílico	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	265,360	538,563	546,812
Precisión intermedia	110,631	493,790	511,811

Coefficiente Correlación Pearson para alcohol N Amilico

N Amílico	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,999
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para N Amilico

N Amílico	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	1,000	0,999	0,999
Precisión Intermedia	1	0,999	0,998	0,998

Anova de un factor para Alcohol N Amilico

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	2679408646,527	1	2679408646,527	69494,449
residual	1657896,051	43	38555,722	
TOTAL	2681066542,578	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	5608393878,637	1	5608393878,637	48946,656
residual	12145666,354	106	114581,758	
TOTAL	5620539544,991	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Alcohol Isoamílico	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	263,618	495,786	503,430
Precisión intermedia	221,239	462,396	470,759

Coeficiente Correlación Pearson para Hexanal

Hexanal	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,993
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Hexanal

Hexanal	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,999	0,998	0,998
Precisión Intermedia	1	0,993	0,987	0,987

Anova de un factor para Hexanal

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	957842653,220	1	957842653,220	24045,604
residual	1712880,025	43	39834,419	
TOTAL	959555533,244	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1644849784,443	1	1644849784,443	7845,154
residual	22224431,224	106	209664,446	
TOTAL	1667074215,667	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Hexanal	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	155,066	294,830	302,600
Precisión intermedia	88,573	247,022	258,334

Coeficiente Correlación Pearson para 3 Amil Acetato

3 Amil Acetato	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,997	0,995
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para 3 Amil Acetato

3 Amil Acetato	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,997	0,994	0,994
Precisión Intermedia	1	0,995	0,994	0,994

Anova de un factor para 3 Amil Acetato

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1088805311,855	1	1088805311,855	7667,209
residual	6106346,056	43	142008,048	
TOTAL	1094911657,911	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1184812307,918	1	1184812307,918	1417,529
residual	88597911,156	106	835829,351	
TOTAL	1273410219,074	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Hexanal	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	87,563	311,147	325,817
Precisión intermedia	37,650	203,159	225,744

Coefficiente Correlación Pearson para Furfural

Furfural	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	1,000	0,999
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Furfural

Furfural	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	1,000	0,999	0,999
Precisión Intermedia	1	0,999	0,998	0,998

Anova de un factor para Furfural

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	1244636574,864	1	1244636574,864	56227,377
residual	951838,336	43	22135,775	
TOTAL	1245588413,200	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	2578439346,504	1	2578439346,504	46749,939
residual	5846308,570	106	55153,854	
TOTAL	2584285655,074	107		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Furfural	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	237,123	337,615	343,407
Precisión intermedia	216,217	313,460	319,262

Coeficiente Correlación Pearson para Heptanal

Heptanal	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,999	0,988
N	45,000	108,000

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Heptanal

Heptanal	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,999	0,998	0,998
Precisión Intermedia	1	0,988	0,977	0,976

Anova de un factor para Heptanal

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	446050289,349	1	446050289,349	19767,515
residual	970286,962	43	22564,813	
TOTAL	447020576,311	44		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	741486698,963	1	741486698,963	4424,351
residual	17764771,954	106	167592,188	

TOTAL	759251470,917	107		
-------	---------------	-----	--	--

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Heptanal	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	140,597	200,922	206,770
Precisión intermedia	66,516	164,594	174,708

ANEXO 13

REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA MEDIANTE EL PAQUETE ESTADÍSTICO DE EXCEL PARA CONGÉNERES

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los congéneres donde el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) es evaluado para cada nivel de concentración.

Valores obtenidos de Acetaldehído

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	2,8	2,3
5	2,6	1,0
10	0,6	1,5
20	0,7	0,9
25	0,1	0,5
30	2,2	1,4
35	1,5	0,6
40	2,9	1,1
50	0,4	1,1

Valores obtenidos de 2 Metil Propanal

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	1,7	3,1
5	1,2	2,8
10	1,5	2,9
20	2,5	2,2
25	0,2	2,7
30	2,7	2,7
35	1,3	2,9
40	1,2	3,2
50	0,7	3,1

Valores obtenidos de N propanol

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	3,3	4,1
5	0,7	12,2
10	2,2	2,8
20	1,9	0,9
25	1,1	2,5
30	0,5	5,5
35	0,8	1,7
40	0,5	2,0
50	1,2	1,3

Valores obtenidos de Acetato de etilo

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	4,1	4,2
5	0,4	9,6
10	0,2	4,8
20	3,0	3,8
25	0,6	4,1
30	0,4	4,9
35	0,7	4,5
40	0,4	4,9
50	0,4	4,8

Valores obtenidos para Sec butanol

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	2,0	6,0
5	1,0	9,0
10	1,0	3,4
20	1,0	0,7
25	1,0	1,5
30	1,0	4,3
35	1,0	0,8

40	1,0	0,7
50	1,0	1,0

Valores obtenidos para Repetibilidad de Isobutanol

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	3,0	3,2
5	1,7	7,6
10	2,3	2,0
20	1,2	1,2
25	0,9	1,6
30	0,6	3,9
35	0,4	1,1
40	0,4	0,9
50	0,9	1,6

Valores obtenidos para Repetibilidad de Metil Isobutirato

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	2,3	3,0
5	1,9	6,0
10	2,3	2,0
20	3,2	6,0
25	0,5	9,0
30	1,0	6,0
35	0,7	8,0
40	0,9	4,0
50	0,4	8,0

Valores obtenidos para Repetibilidad de N butanol

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	3,1	6,6
5	2,3	6,4
10	2,2	3,2

20	0,6	1,5
25	1,5	1,8
30	1,1	5,5
35	1,2	1,5
40	0,6	1,4
50	1,0	1,7

Valores obtenidos para Repetibilidad de Pentanal

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	3,1	7,0
5	2,3	3,0
10	2,2	3,0
20	0,6	5,0
25	1,5	4,0
30	1,1	4,0
35	1,2	4,0
40	0,6	4,0
50	1,0	4,0

Valores obtenidos para Repetibilidad de Sec Butil acetato

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	13,5	17,9
5	1,2	10,0
10	2,8	19,2
20	3,0	8,6
25	0,7	10,2
30	0,1	6,0
35	0,7	9,8
40	0,5	13,9
50	0,4	10,4

Valores obtenidos para Repetibilidad de Alcohol Isoamílico

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	2,1	3,0
5	1,8	12,6
10	1,2	1,6
20	0,7	1,2
25	0,2	1,5
30	0,3	4,3
35	0,7	0,6
40	0,6	8,0
50	0,9	3,9

Valores obtenidos para Repetibilidad de Alcohol N Amílico

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	1,0	3,1
5	1,3	13,7
10	0,9	1,7
20	0,7	1,1
25	0,5	1,0
30	0,4	4,6
35	0,5	0,6
40	0,3	0,5
50	0,8	0,8

Valores obtenidos para Repetibilidad de Hexanal

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	3,4	2,8
5	1,3	10,2
10	1,5	9,2
20	0,8	5,0
25	0,7	5,8
30	0,3	3,8
35	0,7	5,9

40	0,5	6,9
50	0,9	5,8

Valores obtenidos para Repetibilidad de amil acetato

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	5,3	4,1
5	2,2	7,9
10	2,5	24,4
20	1,3	11,0
25	2,3	10,4
30	2,8	9,6
35	0,8	10,8
40	0,7	21,6
50	0,6	11,5

Valores obtenidos para Repetibilidad de Furfural

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	1,7	2,0
5	1,8	9,0
10	0,9	1,4
20	1,4	1,2
25	0,6	1,4
30	0,4	4,7
35	0,5	0,9
40	0,9	0,7
50	1,2	1,2

Valores obtenidos para Repetibilidad de Heptanal

Concentración (ppm)	% RSD repetibilidad	% RSD precisión intermedia
2	3,6	2,5
5	1,9	10,3
10	1,4	10,8
20	1,4	7,0

25	0,7	7,6
30	0,7	4,2
35	0,4	8,5
40	0,6	10,4
50	0,7	7,3

ANEXO 14

CÁLCULO DE ESTADÍSTICO SHAPIRO WILK PARA CONGÉNERES PARA REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA PARA EL MÉTODO 2

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los congéneres donde aparece el W calculado para cada nivel de concentración realizado por SPSS para el método 2.

Estadístico Shapiro Wilk Metanol

Concentración Metanol (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
5	0,860	0,933
10	0,801	0,860
20	0,916	0,839
25	0,728	0,810
30	0,920	0,786
35	0,807	0,938
40	0,719	0,929
50	0,902	0,822

Estadístico Shapiro Wilk IPA

Concentración IPA (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
5	0,941	0,955
10	0,939	0,859
20	0,921	0,913
25	0,916	0,920
30	0,882	0,843
35	0,961	0,785
40	0,941	0,947
50	0,593	0,906

Estadístico Shapiro Wilk AM

Concentración AM (ppm)	Estadístico Shapiro Wilk (W) calculado	Estadístico Shapiro Wilk (W) tabulado
NIVEL	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA
5	0,699	0,933
10	0,926	0,850
20	0,808	0,892
25	0,853	0,838
30	0,914	0,919
35	0,646	0,898
40	0,675	0,919
50	0,620	0,837

ANEXO 15

CÁLCULO DE ESTADÍSTICO DE LEVENE PARA CONGÉNERES, MÉTODO 2

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los congéneres donde aparece el estadístico de Levene calculado para cada nivel de concentración realizado por SPSS.

Estadístico de Levene para Metanol

Metanol	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $_{(10,50)} = 5.9$		
basándose en la media	2,467	7	38
basándose en la mediana	1,432	7	32
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $_{(10,100)} = 5.0$		
basándose en la media	5,252	7	88
basándose en la mediana	3,342	7	88

Estadístico de Levene para IPA

IPA	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $_{(10,50)} = 5.9$		
basándose en la media	2,758	7	38
basándose en la mediana	1,266	7	32
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $_{(10,100)} = 5.0$		
basándose en la media	6,701	7	88
basándose en la mediana	4,999	7	88

Estadístico de Levene para AM

AM	Estadístico Levene (W calculado)	gl ₁	gl ₂
REPETIBILIDAD	W tabulado $_{(10,50)} = 5.9$		
basándose en la media	2,647	7	38
basándose en la mediana	0,666	7	32
PRECISION INTERMEDIA	W tabulado $_{(10,100)} = 5.0$		
basándose en la media	5,252	7	88
basándose en la mediana	3,342	7	88

ANEXO 16

CÁLCULO DE COEFICIENTE CORRELACION DE PEARSON PARA REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA MÉTODO 2

En las siguientes tablas se muestra el coeficiente de correlación de Pearson para el método 2 por repetibilidad y precisión intermedia

Coeficiente Correlación Pearson para Metanol

Metanol	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,998	0,977
N	40	96

N: número de muestras

Resumen de Modelo para Metanol

Metanol	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,998	0,996	0,996
Precisión Intermedia	1	0,991	0,991	0,982

Anova de un factor para Metanol

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	152759224,802	1	152759224,802	3499,761
residual	1658641,973	38	43648,473	
TOTAL	154417866,775	39		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	169652655,876	1	169652655,876	3573,646
residual	4462487,530	94	47473,272	
TOTAL	174115143,406	95		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

Metanol	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	59,159	133,586	143,053
Precisión intermedia	59,780	90,9667	97,218

Coeficiente Correlación Pearson para IPA

IPA	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,993	0,991
N	40	96

N: número de muestras

Resumen de Modelo para IPA

IPA	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,993	0,985	0,985
Precisión Intermedia	1	0,991	0,981	0,981

Anova de un factor para IPA

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	351469155,206	1	351469155,206	2564,236
residual	5208502,394	38	137065,852	
TOTAL	356677657,600	39		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	782465784,922	1	782465784,922	4971,337
residual	14795172,703	94	157395,454	
TOTAL	797260957,625	95		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

IPA	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	50,638	201,421	218,196
Precisión intermedia	70,508	196,382	207,763

Coeficiente Correlación Pearson para AM

AM	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Correlación de Pearson	0,996	0,972
N	40	96

N: número de muestras

Resumen de Modelo para AM

AM	Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido
Repetibilidad	1	0,996	0,993	0,992
Precisión Intermedia	1	0,972	0,945	0,945

Anova de un factor para AM

Repetibilidad	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	213209733,711	1	213209733,711	5057,737
residual	1601896,289	38	42155,165	
TOTAL	214811630,000	39		
Precisión Intermedia	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado
regresión	439331389,041	1	439331389,041	1622,118
residual	25458786,792	94	270838,157	
TOTAL	464790175,833	95		

Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$

AM	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza	
Repetibilidad	71,118	158,760	168,063
Precisión intermedia	40,276	143,951	158,880

ANEXO 17

REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA POR EXCEL PARA EL MÉTODO 2

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los congéneres donde aparece la media, la desviación estándar y el % RSD.

Valores obtenidos para Repetibilidad de Metanol

Concentración (ppm)	% RSD Repetibilidad	% RSD Precisión Intermedia
5	1,7	2,3
10	0,4	1,8
20	0,1	1,0
25	0,9	0,7
30	0,1	1,9
35	0,1	0,2
40	0,1	0,1
50	0,1	0,1

Valores obtenidos para Repetibilidad de IPA

Concentración (ppm)	% RSD Repetibilidad	% RSD Precisión Intermedia
5	0,7	2,5
10	0,3	4,2
20	0,1	6,0
25	0,3	6,1
30	0,3	2,5
35	0,4	3,7
40	0,2	3,6
50	0,3	6,1

Valores obtenidos para Repetibilidad de AM

Concentración (ppm)	% RSD Repetibilidad	% RSD Precisión Intermedia
5	2,0	1,9
10	1,0	4,5
20	1,2	14,2

25	0,2	12,1
30	0,4	7,6
35	0,3	6,6
40	0,2	9,6
50	0,3	13,7

ANEXO 18

COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS EXPERIMENTALES, PRUEBA t PARA MÉTODO 1 Y 2

Comparación de medias para Acetaldehído

Concentración Acetaldehído (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	6	0,91	2,4
5	4	5,67	2,7
10	14	11,88	2,1
20	8	1,71	2,2
25	12	0,26	2,1
30	5	2,40	2,5
35	4	3,67	2,5
40	4	1,52	2,7
50	14	1,07	2,1

gl= grados de libertad

Comparación de medias para metanol

Concentración metanol (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
5	8	2,0	2,3
10	5	1,2	2,5
20	4	1,5	2,7
25	5	6,4	2,5
30	14	5,5	2,1
35	8	3,4	2,3
40	4	3,2	2,7
50	4	4,6	2,7

gl= grados de libertad

Comparación de medias para IPA

Concentración IPA (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
5	14	1,2	2,1
10	11	1,7	2,2
20	11	1,2	2,2
25	11	1,6	2,2
30	12	2,5	2,1

35	12	1,0	2,1
40	11	1,3	2,2
50	11	1,4	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para AM

Concentración AM (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
5	8	16,0	2,3
10	13	2,0	2,1
20	11	2,0	2,2
25	11	3,0	2,2
30	11	1,0	2,2
35	11	1,3	2,2
40	11	4,0	2,2
50	11	2,0	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para 2 Metil propanal

Concentración 2 Metil propanal (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	13	0,6	2,5
5	12	1,8	2,8
10	14	0,7	2,1
20	6	0,2	2,3
25	11	5,6	2,2
30	13	1,2	2,6
35	14	2,1	2,6
40	11	12,8	2,8
50	7	131,6	2,1

gl= grados de libertad

Comparación de medias para n propanol

Concentración n propanol (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	9	1,8	2,3
5	11	3,9	2,2
10	9	2,2	2,3
20	4	4,4	2,6

25	14	4,3	2,1
30	11	5,9	2,2
35	13	4,8	2,1
40	14	48,2	2,1
50	7	8,9	2,3

gl= grados de libertad

Comparación de medias para acetato de etilo

Concentración acetato de etilo (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	8	2,5	2,3
5	11	8,1	2,3
10	11	4,3	2,3
20	8	8,3	2,3
25	12	11,4	2,2
30	11	6,8	2,2
35	12	10,5	2,2
40	11	11,7	2,3
50	11	13,0	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Sec butanol

Concentración Sec butanol (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	14	2,3	2,1
5	11	7,1	2,2
10	14	3,2	2,1
20	5	10,4	2,6
25	14	9,0	2,1
30	11	8,7	2,2
35	11	12,5	2,2
40	9	17,5	2,2
50	8	13,4	2,3

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Isobutanol

Concentración Isobutanol (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	8	0,4	2,3

5	13	2,1	2,8
10	6	3,1	2,4
20	7	7,6	2,4
25	12	7,0	2,2
30	12	9,4	2,2
35	15	12,7	2,2
40	13	19,9	2,1
50	12	9,8	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Metil Isobutirato

Concentración Metil Isobutirato (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	9	1,5	2,2
5	14	17,6	2,1
10	12	12,1	2,2
20	11	13,0	2,3
25	11	8,7	2,3
30	12	9,9	2,2
35	11	9,8	2,2
40	11	1,3	2,3
50	11	13,6	2,3

gl= grados de libertad

Comparación de medias para n butanol

Concentración N Butanol (ppm)	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2	14	1,5	2,1
5	15	2,9	2,1
10	10	4,8	2,3
20	15	13,9	2,1
25	8	5,8	2,3
30	13	6,6	2,5
35	8	6,3	2,5
40	14	12,5	2,1
50	11	7,3	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Pentanal

Concentración Pentanal	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	11	1,5	2,2
5 ppm	8	0,5	2,3
10 ppm	5	2,7	2,5
20 ppm	11	13,2	2,2
25 ppm	11	6,6	2,2
30 ppm	12	0,8	2,2
35 ppm	13	7,4	2,1
40 ppm	12	11,1	2,1
50 ppm	14	8,9	2,1

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Sec Butil Acetato

Concentración Sec Butil Acetato	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	13	4,0	2,2
5 ppm	12	4,8	2,2
10 ppm	13	10,5	2,2
20 ppm	14	8,1	2,1
25 ppm	11	3,9	2,3
30 ppm	11	15,5	2,3
35 ppm	11	7,4	2,3
40 ppm	11	7,4	2,3
50 ppm	11	8,1	2,3

gl= grados de libertad

Comparación de medias para alcohol isoamílico

Concentración Isoamílico	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	10	0,6	2,2
5 ppm	12	3,0	2,2
10 ppm	9	9,7	2,3
20 ppm	11	12,9	2,2
25 ppm	12	9,7	2,2
30 ppm	11	8,8	2,2
35 ppm	5	12,8	2,5
40 ppm	11	3,5	2,2
50 ppm	13	6,9	2,1

gl= grados de libertad

Comparación de medias para alcohol n amílico

Concentración N Amilico	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	14	2,9	2,2
5 ppm	11	2,0	2,2
10 ppm	12	11,6	2,1
20 ppm	10	14,2	2,2
25 ppm	12	13,7	2,1
30 ppm	11	7,3	2,2
35 ppm	9	16,7	2,3
40 ppm	11	28,7	2,2
50 ppm	7	16,2	2,4

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Hexanal

Concentración Hexanal	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	6	1,6	2,5
5 ppm	12	4,0	2,8
10 ppm	12	7,4	2,1
20 ppm	12	11,0	2,3
25 ppm	11	8,8	2,2
30 ppm	11	17,0	2,2
35 ppm	11	9,1	2,2
40 ppm	11	10,1	2,8
50 ppm	12	9,6	2,1

gl= grados de libertad

Comparación de medias para 3 amil acetato

Concentración 3 amil acetato	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	6	0,0	2,5
5 ppm	14	10,3	2,1
10 ppm	12	9,5	2,2
20 ppm	12	7,2	2,3
25 ppm	14	11,0	2,1
30 ppm	14	13,0	2,1
35 ppm	11	14,1	2,1
40 ppm	11	7,2	2,1

50 ppm	11	14,1	2,1
--------	----	------	-----

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Furfural

Concentración Furfural	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	9	0,1	2,3
5 ppm	13	0,1	2,2
10 ppm	10	11,6	2,2
20 ppm	5	9,2	2,3
25 ppm	14	10,1	2,2
30 ppm	11,6	7,4	2,6
35 ppm	10,7	13,6	2,2
40 ppm	5,3	13,0	2,6
50 ppm	4,3	3,2	3,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Heptanal

Concentración Heptanal	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
2 ppm	5	0,9	2,5
5 ppm	13	3,8	2,2
10 ppm	12	3,7	2,2
20 ppm	13	7,3	2,3
25 ppm	11	6,6	2,2
30 ppm	12	14,7	2,6
35 ppm	11	7,3	2,6
40 ppm	11	7,1	2,8
50 ppm	11	8,2	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para Metanol

Concentración metanol	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
5 ppm	8	2,0	2,2
10 ppm	5	1,0	2,1
20 ppm	4	1,0	2,1
25 ppm	5	6,4	2,2
30 ppm	14	5,5	2,1

35 ppm	8	3,4	2,3
40 ppm	4	3,2	2,7
50 ppm	4	1,4	2,7

gl= grados de libertad

Comparación de medias para IPA

Concentración IPA	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
5 ppm	14	12	2,1
10 ppm	11	7	2,2
20 ppm	11	12	2,2
25 ppm	11	16	2,2
30 ppm	12	25	2,1
35 ppm	12	10	2,1
40 ppm	11	3	2,2
50 ppm	11	4	2,2

gl= grados de libertad

Comparación de medias para AM

Concentración AM	gl	t calculado	t tabulado 95% confianza
5 ppm	8	16	2,3
10 ppm	13	2	2,1
20 ppm	11	2	2,2
25 ppm	11	3	2,2
30 ppm	11	1	2,2
35 ppm	11	13	2,2
40 ppm	11	4	2,2
50 ppm	11	2	2,2

gl= grados de libertad

ANEXO 19
ESTADÍSTICO F PARA MÉTODO 1 Y 2

Comparación varianzas para acetaldehído

Concentración. Acetaldehído (ppm)	F calculado	F tabulado
5	7,9	3,9
10	5,4	6,5
35	5,3	3,9

Comparación varianzas para Metanol

Concentración (ppm) metanol	F calculado	F tabulado
5	2	6,5
10	19	6,5
20	29	6,5
25	4	3,9
30	116	6,5
35	2	6,5
40	1	6,5
50	2	3,9

Comparación varianzas para IPA

Concentración (ppm) IPA	F calculado	F tabulado
5	11	6,5
10	237	6,5
20	1982	6,5
25	234	6,5
30	49	6,5
35	67	6,5
40	197	6,5
50	383	6,5

Comparación varianzas para AM

Concentración (ppm) AM	F calculado	F tabulado
5	1	6,5
10	23	6,5
20	113	6,5
25	2114	6,5
30	386	6,5
35	238	6,5
40	1773	6,5
50	1651	6,5

Comparación varianzas para 2 Metil propanal

Concentración 2 Metil propanal (ppm)	F calculado	F tabulado
5	4262	6,5
40	89	6,5
50	1	3,9

Comparación varianzas para n propanol

Concentración N Propanol (ppm)	F calculado	F tabulado
5	7	6,5
20	1	6,5
25	46	6,5
30	2	3,9
35	4	3,9
40	7	3,9
50	7	6,5

Comparación varianzas para acetato de etilo

Concentración N propanol (ppm)	F calculado	F tabulado
5	1	6,5
10	372	6,5
20	363	6,5
25	1	6,5
30	36	6,5
35	99	6,5

40	35	6,5
50	117	6,5

Comparación varianzas para Sec butanol

Concentración Sec butanol (ppm)	F calculado	F tabulado
30	57,4	6,5

Comparación varianzas para Iso Butanol

Concentración Iso Butanol (ppm)	F calculado	F tabulado
30	30,8	6,5

Comparación varianzas para Metil Isobutirato

Concentración Metil Isobutirato (ppm)	F calculado	F tabulado
5	8	3,9
10	5	6,5
20	1	6,5
25	46	6,5
30	2	3,9
35	5	3,9
50	8	6,5

Comparación varianzas para n butanol

Concentración N Butanol (ppm)	F calculado	F tabulado
5	4	6,5
10	7	6,5
20	1	6,5
25	5	6,5
30	1	3,9
35	17	6,5
40	1	6,5
50	5	6,5

Comparación varianzas para Pentanal

Concentración (ppm) Pentanal	F calculado	F tabulado
10	3	3,9
20	44	6,5
25	2	6,5
35	2	6,5
40	20	6,5
50	4	6,5

Comparación varianzas para Sec Butil Acetato

Concentración Sec Butil Acetato (ppm)	F calculado	F tabulado
5	52	6,5
10	14	6,5
20	4	6,5
25	120	6,5
30	1264	6,5
35	118	6,5
40	362	6,5
50	385	6,5

Comparación varianzas para Alcohol Isoamílico

Concentración Isoamílico (ppm)	F calculado	F tabulado
5	8	3,9
10	5	6,5
20	1	3,9
25	46	6,5
30	2	3,9
35	5	3,9
40	7	3,9
50	8	6,5

Comparación varianzas para alcohol N Amílico

Concentración N Amílico (ppm)	F calculado	F tabulado
2	2	4

10	5	6,5
20	1	6,5
25	46	6,5
30	2	3,9
35	5	3,9
40	7	3,9
50	8	6,5

Comparación varianzas para Hexanal

Concentración Hexanal (ppm)	F calculado	F tabulado
5	46	6,5
10	22	6,5
20	24	6,5
25	44	6,5
30	68	6,5
35	46	6,5
40	90	6,5
50	23	6,5

Comparación varianzas para 3 Amil Acetato

Concentración 3 amil acetato (ppm)	F calculado	F tabulado
5	8	3,9
10	5	6,5
20	1	6,5
25	46	6,5
30	2	3,9
35	5	3,9
40	7	3,9
50	8	6,5

Comparación varianzas para Furfural

Concentración Furfural (ppm)	F calculado	F tabulado
5	24	6,5
10	2	6,5
20	2	3,9

25	4	6,5
30	79	6,5
35	2	6,5
40	3	3,9
50	10	3,9

Comparación varianzas para Heptanal

Concentración heptanal (ppm)	F calculado	F tabulado
5	8	3,9
10	5	6,5
20	1	6,5
25	46	3,9
30	2	6,5
35	5	6,5
40	7	6,5
50	8	3,9

ANEXO 20

Cuantiles para el estadístico de la prueba de Shapiro - Wilk

.	0,01	0,02	0,05	0,1	0,5	0,9	0,95	0,98	0,99
3	0,753	0,756	0,767	0,789	0,959	0,998	0,999	1	1
4	0,687	0,707	0,748	0,792	0,935	0,987	0,992	0,996	0,997
5	0,686	0,715	0,762	0,806	0,927	0,979	0,986	0,991	0,993
6	0,713	0,743	0,788	0,826	0,927	0,974	0,981	0,986	0,989
7	0,73	0,76	0,803	0,838	0,928	0,972	0,979	0,985	0,988
8	0,749	0,778	0,818	0,851	0,932	0,972	0,978	0,984	0,987
9	0,764	0,791	0,829	0,859	0,935	0,972	0,978	0,984	0,986
10	0,781	0,806	0,842	0,869	0,938	0,972	0,978	0,983	0,986
11	0,792	0,817	0,85	0,876	0,94	0,973	0,979	0,984	0,986
12	0,805	0,828	0,859	0,883	0,943	0,973	0,979	0,984	0,986
13	0,814	0,837	0,866	0,889	0,945	0,974	0,979	0,984	0,986
14	0,825	0,846	0,874	0,895	0,947	0,975	0,98	0,984	0,986
15	0,835	0,855	0,881	0,901	0,95	0,975	0,98	0,984	0,987
16	0,844	0,863	0,887	0,906	0,952	0,976	0,981	0,985	0,987
17	0,851	0,869	0,892	0,91	0,954	0,977	0,981	0,985	0,987
18	0,858	0,874	0,897	0,914	0,956	0,978	0,982	0,986	0,988
19	0,863	0,879	0,901	0,917	0,957	0,978	0,982	0,986	0,988
20	0,868	0,884	0,905	0,92	0,959	0,979	0,983	0,986	0,988
21	0,873	0,888	0,908	0,923	0,96	0,98	0,983	0,987	0,989
22	0,878	0,892	0,911	0,926	0,961	0,98	0,984	0,987	0,989
23	0,881	0,895	0,914	0,928	0,962	0,981	0,984	0,987	0,989
24	0,884	0,898	0,916	0,93	0,963	0,981	0,984	0,987	0,989
25	0,888	0,901	0,918	0,931	0,964	0,981	0,985	0,988	0,989
26	0,891	0,904	0,92	0,933	0,965	0,982	0,985	0,988	0,989
27	0,894	0,906	0,923	0,935	0,965	0,982	0,985	0,988	0,99
28	0,866	0,908	0,924	0,936	0,966	0,982	0,985	0,988	0,99
29	0,898	0,91	0,926	0,937	0,966	0,982	0,985	0,988	0,99
30	0,9	0,912	0,927	0,939	0,967	0,983	0,985	0,988	0,99
31	0,902	0,914	0,929	0,94	0,967	0,983	0,986	0,988	0,99
32	0,904	0,915	0,93	0,941	0,968	0,983	0,986	0,988	0,99
33	0,906	0,917	0,931	0,942	0,968	0,983	0,986	0,989	0,99
34	0,908	0,919	0,933	0,943	0,969	0,983	0,986	0,989	0,99
35	0,91	0,92	0,934	0,944	0,969	0,984	0,986	0,989	0,99
36	0,912	0,922	0,935	0,945	0,97	0,984	0,986	0,989	0,99
37	0,914	0,924	0,936	0,946	0,97	0,984	0,987	0,989	0,99
38	0,916	0,925	0,938	0,947	0,971	0,984	0,987	0,989	0,99
39	0,917	0,927	0,939	0,948	0,971	0,984	0,987	0,989	0,991
40	0,919	0,928	0,94	0,949	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
41	0,92	0,929	0,941	0,95	0,972	0,985	0,997	0,989	0,991
42	0,922	0,93	0,942	0,951	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
43	0,923	0,932	0,943	0,951	0,973	0,985	0,987	0,99	0,991
44	0,924	0,933	0,944	0,952	0,973	0,985	0,987	0,99	0,991
45	0,926	0,934	0,945	0,953	0,973	0,985	0,988	0,99	0,991
46	0,927	0,936	0,945	0,953	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
47	0,928	0,936	0,946	0,954	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
48	0,929	0,937	0,947	0,954	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991
49	0,929	0,937	0,947	0,955	0,974	0,986	0,988	0,99	0,991
50	0,93	0,933	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,99	0,991

ANEXO 21

Cuantiles para el estadístico de la prueba de Levene

Tamaños		Pruebas										
n_1	n_2	Ba	l.m	l.me	l.r	Fli	h.mi	h.ma	teo	coc	la	la.m
10	10	4.6	5.7	3.3	5.0	3.2	4.6	4.6	5.0	4.6	6.5	12.4
10	20	3.9	4.9	3.4	4.7	3.5	1.7	10.8	5.0	9.6	6.1	9.0
10	30	5.4	5.1	3.5	4.5	3.7	1.9	18.2	5.5	15.8	6.7	9.5
10	50	5.2	5.9	4.7	5.8	5.1	2.3	26.6	6.3	25.0	6.6	8.5
10	100	4.2	5.0	4.4	4.9	4.7	0.8	100.0	5.3	34.6	7.1	8.4
20	20	3.5	4.4	3.6	4.3	3.8	3.4	3.4	3.8	3.0	4.8	6.6
20	30	4.9	4.9	3.3	4.1	3.1	2.6	7.1	5.0	5.8	5.2	7.2
20	50	4.7	4.8	4.0	4.7	3.8	1.4	13.0	5.0	11.5	5.6	7.3
20	100	5.4	5.3	4.7	5.4	5.2	1.1	100.0	5.7	20.3	6.8	7.5
30	30	4.3	5.1	3.8	4.6	3.4	4.2	4.2	4.4	3.4	4.4	6.3
30	50	4.0	3.7	3.0	3.6	2.8	1.9	7.2	4.5	6.0	4.1	5.7
30	100	5.3	5.2	5.2	5.3	5.2	2.1	100.0	5.4	12.3	5.8	7.1
50	50	4.8	4.3	3.6	4.1	3.7	3.4	3.4	4.8	2.9	4.9	6.0
50	100	5.4	5.4	5.0	5.4	4.8	1.4	100.0	5.5	6.6	5.2	6.2
100	100	4.1	4.7	4.0	4.6	4.2	100.0	100.0	4.2	2.0	5.1	5.3

ANEXO 22

Valor de t para un intervalo de confianza de valor critico de $|t|$ para valores de P

Número de grados de libertad	90% 0.10	95% 0.05	98% 0.02	99% 0.01
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Los valores críticos de $|t|$ son adecuados para una prueba de dos colas. Para una prueba de una cola el valor se toma de la columna para dos veces el valor de P deseado, por ejemplo, para una prueba de una cola, $P = 0,005$, 5 grados de libertad, el valor critico se lee de la columna $P = 0,10$ y es igual a 0,02.

ANEXO 23

Valores críticos de F para una prueba de dos colas (P = 0,05)

$\nu_2 \backslash \nu_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464

ϑ_1 = número de grados de libertad del numerador

ϑ_2 = número de grados de libertad del denominador

ANEXO 24

Control de aparatos volumétricos factor “Z” (mL/g)

temperatura de control [°C]	gama de presión atmosférica inferior 980 a 1000 hPa		gama de presión atmosférica media 1000 a 1020 hPa		gama de presión atmosférica superior 1020 a 1040 hPa	
	material: vidrio		material: vidrio		material: vidrio	
	DURAN® Z [ml/g]	AR-Glas® Z [ml/g]	DURAN® Z [ml/g]	AR-Glas® Z [ml/g]	DURAN® Z [ml/g]	AR-Glas® Z [ml/g]
15	1,00200	1,00208	1,00202	1,00211	1,00204	1,00213
15,5	1,00207	1,00215	1,00209	1,00217	1,00211	1,00219
16	1,00214	1,00221	1,00216	1,00223	1,00218	1,00225
16,5	1,00222	1,00228	1,00224	1,00230	1,00226	1,00232
17	1,00230	1,00235	1,00232	1,00237	1,00234	1,00239
17,5	1,00238	1,00242	1,00240	1,00245	1,00242	1,00247
18	1,00246	1,00250	1,00248	1,00252	1,00251	1,00254
18,5	1,00255	1,00258	1,00257	1,00260	1,00260	1,00262
19	1,00264	1,00266	1,00266	1,00268	1,00268	1,00270
19,5	1,00274	1,00275	1,00276	1,00277	1,00278	1,00279
20	1,00283	1,00283	1,00285	1,00285	1,00287	1,00287
20,5	1,00293	1,00292	1,00295	1,00294	1,00297	1,00296
21	1,00303	1,00301	1,00305	1,00303	1,00307	1,00305
21,5	1,00313	1,00311	1,00316	1,00313	1,00318	1,00315
22	1,00321	1,00318	1,00323	1,00320	1,00325	1,00322
22,5	1,00335	1,00331	1,00337	1,00333	1,00339	1,00335
23	1,00346	1,00341	1,00348	1,00343	1,00350	1,00345
23,5	1,00358	1,00352	1,00360	1,00354	1,00362	1,00356
24	1,00369	1,00362	1,00371	1,00364	1,00373	1,00366
24,5	1,00381	1,00373	1,00383	1,00375	1,00385	1,00377
25	1,00393	1,00384	1,00395	1,00386	1,00397	1,00389
25,5	1,00405	1,00396	1,00408	1,00398	1,00410	1,00400
26	1,00418	1,00408	1,00420	1,00410	1,00422	1,00412
26,5	1,00431	1,00420	1,00433	1,00422	1,00435	1,00424
27	1,00444	1,00432	1,00446	1,00434	1,00448	1,00436
27,5	1,00457	1,00444	1,00459	1,00447	1,00461	1,00449
28	1,00471	1,00457	1,00473	1,00459	1,00475	1,00461
28,5	1,00485	1,00470	1,00487	1,00472	1,00489	1,00474
29	1,00499	1,00483	1,00501	1,00485	1,00503	1,00487
29,5	1,00513	1,00497	1,00515	1,00499	1,00517	1,00501
30	1,00527	1,00510	1,00529	1,00512	1,00531	1,00514