

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METANOL Y CONGÉNERES EN  
ALCOHOL ETÍLICO, MEDIANTE LA ESTANDARIZACIÓN DE UNA  
METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA EN LA INDUSTRIA LICORERA DEL  
CAUCA**

**EDWIN ALFREDO CIFUENTES MUÑOZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2018**

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METANOL Y CONGÉNERES EN  
ALCOHOL ETÍLICO, MEDIANTE LA ESTANDARIZACIÓN DE UNA  
METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA EN LA INDUSTRIA LICORERA DEL  
CAUCA**

Trabajo de grado presentado como  
requisito parcial para optar al título de Químico

**EDWIN ALFREDO CIFUENTES MUÑOZ**

Directora:  
**Dra. TANIA MILENA GUTIÉRREZ VALENCIA**

Asesora:  
**Química CAROLINA SOLANO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2018**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer sinceramente a todas las personas que compartieron sus conocimientos y tiempo para la realización de este trabajo, en especial a mi directora Tania Milena Gutiérrez Valencia y al profesor German Cuervo Ochoa que de la mano del grupo de investigación GIPEL estuvieron pendientes del desarrollo de este trabajo y que son profesionales muy competentes y con una calidad humana digna de admirar. Agradezco a la Industria Licorera del Cauca por financiar este proyecto, por permitirme acceder a sus instalaciones, brindarme información pertinente y colaborar en el desarrollo de este trabajo mediante el área de control de calidad a cargo de la jefa Carolina Solano. Agradezco a la Universidad del Cauca y más concretamente, al departamento de química que cuenta con un excelente plantel académico y compromiso con sus estudiantes, por último gracias a mis compañeros y futuros colegas que a su manera, colaboraron con mi formación como profesional.

### **Dedicatoria**

A mi madre, que me inculcó la idea de conseguir un título profesional y se esforzó tenazmente para brindarme el apoyo necesario para alcanzar esta meta, a mis hermanas Julieta y Yady, así como a mi familia Muñoz, quienes me hacen sentir orgulloso por lo logrado.

A aquellos amigos con quienes formé fuertes lazos de amistad, Fernández, Carolina, Yessica, Andrea, Adrian, Ana y Daniela, y a otros de paso con quienes compartí agradables momentos de compañerismo, a los compañeros de R4M y a mis amigos de toda la vida, Rodrigo y J. José.

En especial le dedico este trabajo a mi pueblo natal, Pitalito-Huila, lugar que se ha ganado mi aprecio y profundo respeto.

# Contenido

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<b>1. Planteamiento del problema</b> .....	5
<b>2. Marco teórico y estado del arte</b> .....	6
<b>2.1 Producción de alcohol etílico</b> .....	6
2.1.1 Fermentación .....	6
2.1.2 Destilación .....	6
<b>2.2 Generalidades sobre el metanol y los congéneres</b> .....	7
2.2.1 Metanol .....	8
2.2.2 Iso-propanol y n-propanol .....	8
2.2.3 Iso-butanol, sec-butanol, n-butanol .....	9
2.2.4 3-metilbutanol y 2-metilbutanol .....	9
2.2.5 Acetaldehído .....	10
2.2.6 Etilacetato .....	10
2.2.7 Metilacetato .....	11
2.2.8 Furfural .....	11
<b>2.3 Control y regulación de metanol y congéneres en alcohol y bebidas alcohólicas</b> .....	12
2.3.1 Reglamento de la Comunidad Europea (CE) .....	12
2.3.2 Norma Técnica Colombiana (NTC) .....	13
<b>2.4 Metanol y congéneres en bebidas alcohólicas</b> .....	16
<b>2.5 Metodologías cromatográficas para determinar metanol y congéneres</b> .....	17
<b>2.6 Validación de metodologías analíticas</b> .....	19
2.6.1 Especificidad .....	19
2.6.2 Exactitud .....	20
2.6.3 Precisión .....	20
2.6.4 Límite de detección (LD) .....	20
2.6.5 Límite de cuantificación (LC) .....	21
2.6.6 Linealidad .....	21
<b>2.7 Análisis estadístico</b> .....	21
2.7.1 Comparación de una media experimental con un dato conocido .....	21
2.7.2 Comparación de dos medias experimentales .....	22

2.7.3 Comparación de dos o más medias experimentales mediante ANOVA .....	23
1. <i>Variación dentro de muestras</i> .....	23
2. <i>Variación entre muestras</i> .....	23
2.7.4 Distribución normal de las poblaciones (prueba de Shapiro-Wilk).....	24
2.7.5 Prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) .....	25
3. Objetivos .....	26
3.1 Objetivo general .....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. Metodología.....	27
4.1 Materiales, equipos y reactivos .....	27
4.2 Calibración de material volumétrico .....	28
4.3 Preparación de soluciones estándar .....	29
4.4 Evaluación de las condiciones cromatográficas.....	29
4.4.1 Condiciones iniciales del método cromatográfico.....	30
4.4.2 Tipo de columna .....	30
4.4.3 Técnica de inyección.....	30
4.4.4 Efecto del solvente .....	31
4.4.5 Diseño experimental para la temperatura de análisis y flujo de gas portador .....	31
4.5 Elección del patrón interno .....	32
4.6 Determinación de los parámetros de validación.....	32
4.6.1 Límites de detección y cuantificación .....	32
4.6.2 Linealidad y rango dinámico.....	32
4.6.3 Precisión .....	33
1. <i>Repetibilidad</i> .....	34
2. <i>Precisión intermedia</i> .....	34
3. <i>Reproducibilidad</i> .....	35
4.6.4 Exactitud .....	35
4.6.5 Robustez .....	35
4.7 Estabilidad térmica de las soluciones patrón.....	36
4.8 Examen de aptitud del método.....	36
4.9 Aplicación en muestras reales de la Industria Licorera del Cauca y relacionadas .....	36
5. Análisis de resultados.....	37
5.1 Calibración del material de vidrio .....	37
5.2 Evaluación de las condiciones cromatográficas.....	38

5.2.1 Condiciones generales del método cromatográfico .....	38
5.2.2 Tipo de columna .....	38
1. HP-5 (30m X 0,32mm X 0,25µm) .....	38
2. HP-INNOWax (30m X 0,25mm X 0,25µm).....	39
3. AT <sup>TM</sup> – AQUAWAX (60 m X 0,25 mm X 0,25 µm).....	40
4. DB-624 UI (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm).....	40
5.2.3 Técnica de inyección.....	41
5.2.4 Efecto del solvente .....	42
5.2.5 Diseño experimental para la temperatura del horno y el flujo de gas portador.....	43
5.3 Elección del patrón interno .....	48
5.4 Estandarización y validación de la metodología.....	49
5.4.1 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC).....	49
5.4.2 Linealidad y rango dinámico.....	50
5.4.3 Precisión .....	50
1. Repetibilidad .....	50
2. Precisión intermedia.....	52
3. Reproducibilidad.....	53
5.4.4 Exactitud .....	54
5.4.5 Robustez .....	55
5.5 Estabilidad térmica de las soluciones .....	57
5.6 Examen de aptitud.....	59
5.7 Implementación del método en muestras de la Industria Licorera del Cauca .....	59
6. Conclusiones .....	61
7. Recomendaciones.....	62
8. Bibliografía .....	63

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características y agrupación del metanol y congéneres de acuerdo a su familia química .....	12
<b>Tabla 2.</b> Características de algunas bebidas espirituosas según la CE .....	13
<b>Tabla 3.</b> Características de algunas bebidas alcohólicas según normativas nacionales.....	15
<b>Tabla 4.</b> Contenido en mg/L alcohol anhidro de metanol y algunos congéneres en bebidas alcohólicas .....	16
<b>Tabla 5.</b> Material utilizado en los procedimientos .....	27
<b>Tabla 6.</b> Equipos utilizados en los procedimientos .....	27
<b>Tabla 7.</b> Reactivos utilizados en los procedimientos.....	28
<b>Tabla 8.</b> Preparación de la solución de trabajo inicial .....	29
<b>Tabla 9.</b> Características de las columnas evaluadas .....	30
<b>Tabla 10.</b> Factores y niveles del diseño experimental .....	31
<b>Tabla 11.</b> Resumen del diseño experimental .....	31
<b>Tabla 12.</b> Matriz del Diseño experimental .....	31
<b>Tabla 13.</b> Propiedades de los posibles patrones internos ensayados .....	32
<b>Tabla 14.</b> Solución de trabajo para determinar la linealidad .....	33
<b>Tabla 15.</b> Concentración en mg/L, obtenida para cada uno de los niveles de la curva de calibración, elaborados a partir de la tabla 14.....	34
<b>Tabla 16.</b> Relaciones de concentración ( $C_A/C_{PI}$ ) obtenidas para los niveles de la curva de calibración .....	34
<b>Tabla 17.</b> Concentraciones utilizadas para evaluar la exactitud .....	35
<b>Tabla 18.</b> Conjunto de muestras reales analizadas, origen y tamaño muestral.....	37
<b>Tabla 19.</b> Resultados de la calibración de algunos balones aforados de acuerdo a la ecuación 27 .....	37
<b>Tabla 20.</b> Valores óptimos arrojados por el diseño experimental .....	47
<b>Tabla 21.</b> Resolución y tiempo de análisis de los experimentos 12,13 y 14 .....	48
<b>Tabla 22.</b> Límites de detección y cuantificación para los congéneres.....	49
<b>Tabla 23.</b> Coeficientes de determinación lineal obtenidos .....	50
<b>Tabla 24.</b> Significancia obtenida mediante la prueba de Shapiro-Wilk .....	51
<b>Tabla 25.</b> Significancia obtenida por el análisis de varianza ANOVA, CV (%) para las pendientes de las curvas de calibración.....	52
<b>Tabla 26.</b> Significancia obtenida mediante la prueba de Shapiro-Wilk .....	52
<b>Tabla 27.</b> Significancia obtenida en el ANOVA, CV para las pendientes de las curvas.....	53
<b>Tabla 28.</b> Significancia de las pruebas de Shapiro-Wilk y ANOVA, CV para las pendientes.....	54
<b>Tabla 29.</b> Concentraciones reales y experimentales obtenidas en la determinación de la exactitud ....	55
<b>Tabla 30.</b> Promedio de relación de áreas obtenido por cada analista para cada nivel y analito en la medida de la robustez .....	56
<b>Tabla 31.</b> Significancia obtenida para la prueba t .....	57
<b>Tabla 32.</b> Significancia para la prueba t de la estabilidad, CV para la estabilidad a 6 y 12 horas .....	58
<b>Tabla 33.</b> % Error obtenidos en el examen de aptitud.....	59
<b>Tabla 34.</b> Contenido de metanol y algunos congéneres en materias primas y productos de la ILC.....	60
<b>Tabla 35.</b> Contenido de metanol y algunos congéneres en productos externos a la ILC .....	61

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Cromatograma obtenido por Jung et al. (2013) en la separación de metanol y algunos congéneres.....	18
<b>Figura 2.</b> Cromatograma obtenido con la columna HP-5.....	38
<b>Figura 3.</b> Cromatograma obtenido con la columna HP-INNOWax.....	39
<b>Figura 4.</b> Cromatograma obtenido con la columna DB-624 UI.....	40
<b>Figura 5.</b> Cromatograma obtenido con la inyección por headspace.....	42
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas obtenidos para una solución de igual concentración pero aforadas en soluciones etanólicas de diferente proporción.....	43
<b>Figura 7.</b> Diagramas de Pareto obtenidos para a) la resolución total y b) el tiempo de análisis.....	44
<b>Figura 8.</b> Gráficas de efectos principales obtenidas para a) la resolución total y b) el tiempo de análisis.....	44
<b>Figura 9.</b> Gráficas de interacción obtenidas para a) la resolución total y b) el tiempo de análisis.....	45
<b>Figura 10.</b> Superficie de respuesta obtenida para la resolución total.....	45
<b>Figura 11.</b> Superficie de respuesta obtenida para el tiempo de análisis.....	46
<b>Figura 12.</b> Cromatograma del experimento óptimo para la resolución.....	47
<b>Figura 13.</b> Cromatograma del experimento óptimo para el tiempo de análisis.....	48
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtenido para la separación de metanol y 11 congéneres usando el 3-pentanol como patrón interno y con el método cromatográfico ya optimizado.....	49
<b>Figura 15.</b> Disminución en la relación de áreas de analito y patrón interno ( $A_A/A_{PI}$ ) en función del tiempo transcurrido.....	58

## **Lista de acrónimos y abreviaturas**

ILC: Industria Licorera del Cauca

GC: Cromatografía de gases

FID: Detección de ionización de llama

NTC: Norma Técnica Colombiana

ICONTEC: Instituto Colombiano de Normas Técnicas

LD: Límite de detección

LC: Límite de Cuantificación

PLOT: Columna tubular abierta de capa porosa

WCOT: Columna tubular abierta de pared recubierta.

HS: Headspace

CV: Coeficiente de Variación

RSM: Método de Superficie de Respuesta

S/N: Señal/Ruido

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación lineal

PI: Patrón Interno

G.A. Grado Alcohólico

GABA: Ácido Gamma-AminoButírico

ICH: Conferencia Internacional de Armonización

FDA: Administración de Drogas y Alimentos

DDE: Diseño de Experimentos

CE: Comunidad Europea

## Resumen

La industria de licores siempre ha representado un importante campo en la atención de la población mundial. La producción del alcohol etílico que se utiliza para la elaboración de las bebidas alcohólicas se da a partir de la fermentación del jugo de caña u otras fuentes con alto contenido de azúcares, junto a este alcohol se generan también otro grupo de compuestos químicos que pueden ser persistentes en los procesos posteriores de separación, entre estos compuestos se resaltan el metanol y los denominados congéneres, que tienen influencia directa sobre las propiedades organolépticas del producto que se obtiene tras las utilización del alcohol en efecto. Debido a la importancia que tiene para los fabricantes de bebidas alcohólicas garantizar la calidad de sus productos, una de las funciones del área de control de calidad es regular los niveles de metanol y congéneres en la materia prima y el producto terminado. Es importante que la regulación de dichos compuestos brinde datos confiables, de ahí la importancia de estandarizar las metodologías de análisis, empleando la estadística como medidor de la calidad del método. El análisis cromatográfico representa una importante herramienta en la determinación del metanol y los congéneres, no solo en cuanto a tiempos cortos de análisis y sensibilidad, sino también en cuanto a economía y cuidados ambientales.

En este trabajo se evaluaron las condiciones cromatográficas para determinar metanol y congéneres en productos de la Industria Licorera del Cauca (ILC), con el fin de obtener un procedimiento óptimo en cuanto a tiempo de análisis y calidad analítica de los resultados, posteriormente se estandarizó y validó la metodología de cuantificación de dichos analitos en las muestras de la ILC. El método de análisis se basó en la cromatografía de gases (GC) con detección de ionización de llama (FID), utilizando un equipo AGILENT GC7890B. Se obtuvo un procedimiento óptimo donde se analizaron el metanol y 11 congéneres en menos de 16 minutos utilizando una columna DB-624 UI, programando la temperatura del horno a 35°C/min durante 6 minutos, posteriormente se utilizó una rampa de 10,96°C/min hasta 110°C donde permanece nuevamente constante durante 5 minutos, se utilizó un flujo de helio constante de 1,36 mL/min como gas de arrastre. El método de cuantificación empleado para el metanol y los 11 congéneres, fue la curva con patrón interno, la cual mostró precisión analítica (Intermedia: n=5 días consecutivos y %CV<3%, Reproducibilidad: n=5 días no consecutivos y %CV<3%, repetibilidad: n=3 y CV<3%), límites de detección y cuantificación aceptables (LD<3 mg/L y LC<10 mg/L), linealidad adecuada ( $R^2>0,998$ ), exactitud justa (%Error<15%) y buena aptitud frente a otros métodos y laboratorios (%Error<15%). Las muestras de la ILC mostraron ajustarse a las Normativas Técnicas Colombianas (NTC) para materias primas (alcohol y tafia) y las bebidas alcohólicas producidas (aguardiente, ron y ginebra), además la metodología de análisis sugiere un procedimiento confiable para la identificación de productos adulterados bajo el nombre de la ILC.

**PALABRAS CLAVE:** Metanol, congéneres, cromatografía de gases, bebidas alcohólicas, patrón interno, Industria Licorera del Cauca.

## Abstract

The industry of liquors always has represented an important field in the world's population attention. The production of ethyl alcohol that is used on the elaboration of alcoholic beverages is given from the fermentation of cane sugar juice or other sources with high sugar contents, with this alcohol is aswell generated other group of chemical compounds, they can be persistent in the later separation process, between this compounds highlight the methanol and the denominated congeners, they have direct influence about the product organoleptic properties obtained after using the alcohol indeed. Due to the importance for the manufacturers of alcoholic beverages to secure the quality of their products, one the functions of the quality control area is regulating the methanol and congeners levels in the raw material and the finished product. It is important the regulation of these compounds which provides reliable data, hence the importance of standardizing the methodologies of analysis, using the statistics as a measure of the quality of the method. The chromatographic analysis represents an important tool in the determination of methanol and congeners, it's not just about terms of short analysis times and sensitivity, but also in terms of economy and environmental care.

In this paper the chromatographic conditions were evaluated to determine methanol and congeners in products from the Industria Licorera del Cauca (ILC), in order to obtain an optimal procedure in terms of time analysis and analytical quality of the results, later it was standardized and validated the quantification methodology of said analysis in ILC samples The analysis methods were based on gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID), using an AGILENT GC7890B. An optimal procedure was obtained to methanol and 11 congeners were analyzed in less than 16 minutes using a DB-624 UI column, programming the furnace temperature at 35 °C/min for 6 minutes, then a ramp of 10,96 °C/min was used up to 110°C, it remains constant again for 5 minutes, a constant helium flow of 1,36 mL/min was used as carrier gas.

The quantification method used for methanol and the 11 congeners was the curve with internal standard, which showed analytical precision (Intermediate: n=5 consecutive days and CV <3%, Reproducibility: n=5 non-consecutive days and CV <3%, Repeatability: n=3 and CV <3%), limits of detection and quantification acceptable (LD<3mg/L and LC<10 mg/L), suitable linearity ( $R^2>0.998$ ), accuracy ( % Error <15%) and good aptitude compared to other methods and laboratories (% Error<15%). The samples of the ILC were adjusted to the Colombian Technical Regulations (NTC) for raw materials (alcohol and tafia) and the produced alcoholic beverages (schnapps, rum, and gin), also the analysis methodology suggests a reliable procedure for the identification of adulterated products under the name of the ILC.

**KEYWORDS:** Methanol, congeners, gas chromatography, alcoholic beverages, internal standard, Industria Licorera del Cauca.

## Introducción

En materia de producción industrial, el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2018) reportó que en el 2017 el sector de las bebidas ha sido uno de los que presentó mayores caídas en sus ventas con un -4,5% entre bebidas alcohólicas y no alcohólicas, haciendo un llamado de atención a esta industria y sugiriendo que es necesario implementar estrategias que ayuden a recuperar la relación con el consumidor para que no pierda el interés en este mercado. Los consumidores normalmente tienen marcas de preferencia debido a su gusto por el producto, que es el resultado de unir cada uno de los procedimientos en su elaboración, por esto es importante que las industrias, no solo las industrias de las bebidas, estandaricen dichos procedimientos y sean capaces de garantizar la continuidad de las características en sus productos y de esta manera ganar la confianza del cliente en la marca. La industria licorera en su trabajo de elaborar bebidas alcohólicas, encuentra que las características del producto terminado dependen de las propiedades mismas de las materias primas utilizadas (alcohol etílico, esencias, azúcar, agua, colorantes, entre otros), controlar su calidad es importante para obtener el producto deseado y para mantener el producto dentro de lo que las normas de control exigen.

Los parámetros del alcohol etílico utilizado en la elaboración de las bebidas alcohólicas, son de los más influyentes en la calidad de los productos terminados, los resultados organolépticos obtenidos dependen en gran parte del proceso de producción que se lleve a cabo para la obtención de esta materia prima. El proceso para la producción del alcohol etílico, conlleva a la generación de subproductos que posteriormente son separados por procesos de destilación, entre estos subproductos se encuentran cetonas, aldehídos, ésteres, alcoholes superiores y otros. De acuerdo al tipo de destilación que se lleve a cabo al final del proceso en la producción del alcohol etílico, este alcohol puede contener metanol o congéneres. Los congéneres son una serie de compuestos que han sido identificados a menudo como subproductos en la producción de alcohol etílico, son definidos por la NTC 620 como sustancias volátiles, naturales, diferentes de los alcoholes etílico y metílico, los cuales provienen de las materias primas o que se han generado durante el proceso de elaboración de una bebida alcohólica (Instituto Colombiano de Normas Técnicas-ICONTEC, 2001), la variación en la concentración de estos compuestos en los productos terminados, influye en gran medida sobre las propiedades organolépticas de dicho producto, e incluso, algunos de ellos como el n-propanol, isopropanol e isobutanol, son alta y medianamente tóxicos para el organismo y tienen un sabor y olor fuertemente desagradable en las bebidas (Kostik, Shaban y Bauer, 2013). El metanol es otro subproducto que aunque no es clasificado como congénere, también suele generarse en la producción de alcohol etílico. Junto a los congéneres, la regulación del metanol es importante para garantizar la calidad de las bebidas alcohólicas.

Los métodos clásicos para la determinación de metanol y congéneres se basan en procesos redox o colorimétricos (NTC 196, NTC 242, NTC 269, NTC 5157), que demandan una gran cantidad de reactivos y además, en general pueden ser clasificados como altamente tóxicos para la salud y para el medio ambiente (Bradley *et al.*, 2016). Como alternativa y aprovechando las propiedades físicas y químicas del metanol y los congéneres en conjunto, se han propuesto metodologías cromatográficas que a comparación de las clásicas, requieren de un menor tiempo de análisis, generan menos residuos, son más amigables con el medio ambiente y a menudo sus resultados son más precisos. La cromatografía de gases es una muy atractiva propuesta para el análisis de metanol y congéneres, teniendo en cuenta la estabilidad térmica de estos compuestos, así como su volatilidad y estructura química. La ventaja del uso de metodologías cromatográficas sobre las clásicas, es la posibilidad de realizar análisis multicomponentes, en

comparación con las metodologías clásicas donde había que analizar el metanol y cada uno de los grupos de congéneres por separado, el estudio de las condiciones cromatográficas tales como el modo de inyección, la rampa de temperaturas en el horno, rampa de gas de arrastre y el tipo de columna que se utilice, es fundamental para obtener una buena resolución (Jung, Jung y Muntean, 2013), una buena resolución es el resultado de una buena separación entre los diferentes compuestos analizados y por ende, resultados más reproducibles y confiables.

La ILC en su tarea de determinar y cuantificar metanol y congéneres en el alcohol utilizado para la elaboración de las bebidas alcohólicas, requiere de una metodología rápida, confiable y precisa, un procedimiento analítico capaz de garantizar el cumplimiento de estos requisitos se realiza mediante la estandarización y validación (Moriarty *et al.*, 2018), los cuales se basan en la determinación de precisión (intermedia, reproducibilidad y repetibilidad) , límites de detección y cuantificación (LD y LC), linealidad, exactitud, y robustez mediante el análisis de soluciones de calibración (Katselou *et al.*, 2017). Se han reportado varios trabajos en los cuales se validan metodologías cromatográficas para identificar diferentes analitos mediante cromatografía de gases acoplada a la detección por ionización de llama (Zhang, Wang y Liu, 2015), sistema acoplado con el que cuenta la ILC, y cada proceso de validación se enfoca básicamente en los mismos parámetros, también se cuenta con algunas guías internacionales de validación (U.S. Department of Health and Human Services, 2001) que pueden resultar muy apropiadas para homogeneizar el procedimiento.

Es importante recalcar la importancia de los procesos de estandarización y validación de metodologías de análisis en la certificación de los laboratorios (sobre todo en los de alimentos o productos destinados al consumo humano), dicha certificación es la que evidencia ante clientes y entes regulatorios nacionales e internacionales, la capacidad de la industria para garantizar que sus productos se mantienen de manera confiable, dentro de los parámetros de calidad reglamentados. Se plantea así un método para analizar metanol y congéneres mediante la estandarización y validación de una metodología de cromatografía de gases acoplada a ionización de llama, que permita obtener de manera rápida, resultados confiables y precisos, además de ayudar a disminuir el impacto ambiental que generan las metodologías clásicas de análisis de metanol y congéneres.

## 1. Planteamiento del problema

Determinar metanol y congéneres en muestras de alcohol mediante las metodologías clásicas, demanda una gran cantidad de tiempo, de muestra, de reactivos y de materiales, además los resultados que se obtienen no siempre son adecuados para llevar un continuo control en la calidad de las muestras. Los congéneres son clasificados de acuerdo a sus grupos funcionales en aldehídos, ésteres, alcoholes superiores y furfural. En el caso del metanol, su determinación se realiza colorimétricamente, oxidando el compuesto a metanal por acción del permanganato de potasio en presencia de ácido fosfórico, el metanal reacciona con ácido cromotrópico para formar un compuesto púrpura que absorbe a  $\lambda=575$  nm (NTC 5159). Los aldehídos tras la adición de bisulfito de sodio son determinados por yodometría (NTC 242). Los ésteres son cuantificados por volumetría ácido-base, mediante un proceso de saponificación que se lleva a cabo por acción del hidróxido de sodio (NTC 196). Los alcoholes superiores son determinados por colorimetría tras su reacción con p-dimetil-amino-benzaldehído en medio ácido, el compuesto que se genera es de color rojo y presenta absorbancia a  $\lambda=538$  nm (NTC 5157). El furfural es determinado cualitativamente mediante la adición de anilina sobre la muestra, la presencia de este compuesto desarrolla coloración, por lo tanto esta solución se compara con un blanco (NTC 269). En la Industria Licorera del Cauca (ILC) es necesario que antes de utilizar un alcohol etílico para la elaboración de las bebidas, este alcohol sea analizado para saber si se acepta o se rechaza, la producción diaria de las bebidas alcohólicas sugiere de esta forma que el análisis de metanol y congéneres mediante metodologías clásicas detenga la producción de la empresa durante el tiempo que tarde el analista en realizar los 5 procedimientos indicados previamente, el tiempo es el principal factor debido a las implicaciones en la generación y entrega de resultados y su correspondiente análisis, que representa pérdidas para la empresa a nivel económico cuando dicho tiempo no se optimiza. Detener la producción durante una, dos o hasta más horas, significa para la empresa una pérdida económica significativa y además un estancamiento en sus procesos rutinarios.

El análisis de metanol y congéneres mediante cromatografía de gases puede ser llevado a cabo en un tiempo menor, debido a la posibilidad de realizar análisis multicomponente, es decir, que en una sola muestra se pueden analizar los 5 grupos de compuestos químicos que establece la NTC 620. El estudio de las condiciones cromatográficas puede llevar a la optimización del tiempo necesario para realizar el análisis, de ahí la necesidad de plantear un diseño experimental que permita encontrar dichas condiciones (Miller y Miller, 2002).

Obtener una metodología rápida para el análisis de metanol y congéneres es el primero de los intereses en el ámbito industrial, el segundo es que los resultados que se obtengan tras la aplicación de dicha metodología sean confiables, para conseguirlo se deben realizar los procesos estandarización y validación (Moriarty *et al.*, 2018). La determinación de la precisión, exactitud, linealidad y límites de detección y cuantificación, son parámetros fundamentales en la estandarización de metodologías analíticas (Katselou *et al.*, 2017), que al reportarlos como parte del método, permiten obtener el nivel de confianza deseado identificando hasta qué punto, la metodología ofrece resultados adecuados. Entregar resultados confiables ante entes nacionales o internacionales que otorgan certificaciones de calidad a laboratorios de análisis, representa una necesidad evidente para la ILC, ya que al contar con esta documentación, son capaces de evidenciar su capacidad para llevar a cabo análisis fisicoquímicos sobre sus productos y de esa manera, mantenerlos bajo los estándares de calidad definidos. Una forma de justificar la acreditación de un laboratorio como el de control de calidad en la ILC, es mediante la estandarización y validación de las metodologías de análisis implementadas.

## 2. Marco teórico y estado del arte

### 2.1 Producción de alcohol etílico

Empresas dedicadas a la fabricación de alcohol etílico reportan parcialmente sus procesos y puede llegarse a la conclusión de que sus fundamentos son los mismos en la mayoría de los casos; algunas industrias han difundido los fundamentos de sus procedimientos para la elaboración del alcohol, comparando estos fundamentos con la información parcial ofrecida por los proveedores de la ILC (Sociedad de Destilación de Alcoholes- SODERAL), puede sintetizarse la fabricación del etanol en dos pasos: la fermentación y la destilación.

#### 2.1.1 Fermentación

Mediante la utilización de una cepa de levaduras denominadas *sacharomices cereviseae* (más comúnmente conocida como levadura de pan), se procede a fermentar “mostos azucarados”, los cuales tienen como materia prima un jugo o melaza extraído de la caña de azúcar. Realizando una prefermentación de la cantidad de levaduras inicial, se aumenta su población por reproducción de las mismas, para esto deben acondicionarse las levaduras proporcionándole en ambiente aireado, los nutrientes y compuestos necesarios. Además de los azúcares en el jugo de caña, se adiciona ácido fosfórico, una fuente de nitrógeno (urea, sulfato de amonio) y una serie de elementos como el sodio, potasio, magnesio y aminoácidos que normalmente se encuentran en la materia prima. Cuando se ha alcanzado un volumen de levaduras dado, se pasa la mezcla a los fermentadores, que son cubas de almacenamiento cerradas donde se da el proceso de fermentación anaeróbica de los azúcares contenidos en la materia prima, la alimentación de la cuba se hace progresiva y cuidadosamente. Después de obtener el mosto fermentado o “vino” (grado alcohólico de 8,5-9,0% v/v), se recuperan las levaduras mediante centrifugación y acidificación. El tiempo de fermentación varía según la cantidad de jugo a utilizar y la calidad de las levaduras empleadas, pero normalmente varía alrededor de las doce horas (Tabacal Agroindustria, 2018).

#### 2.1.2 Destilación

El vino que se ha separado en las centrífugas se envía hacia cada una de las columnas destiladoras de cada equipo de destilación. Estos equipos son prácticamente de cobre, excepto por sus columnas destiladoras. El vino entra en la columna destiladora, que está calefaccionada por medio de vapor caliente. El principio básico de la destilación es que el vapor arrastra hacia arriba siempre al más volátil; siguiendo este concepto, el vapor lleva hacia el tope de la columna al alcohol etílico y otros compuestos también volátiles que se forman en el proceso de la fermentación, yendo en sentido contrario (hacia el fondo de la columna), el vino cada vez se diluye más, hasta llegar al fondo de la columna totalmente diluido con trazas de alcohol que no sobrepasan el 0,05% v/v, y en donde se transforma en “vinaza” (vino exento de alcohol).

El alcohol que sale del tope de la columna destiladora a una concentración entre 45- 50% v/v se denomina “flema de mal gusto”; dado que si bien contiene al alcohol etílico, éste está mezclado con otros compuestos que la fermentación ha producido y que deben ser separados, para ello es que se disponen de las columnas de destilación siguientes.

La flema de mal gusto contiene productos de diferente volatilidad al etanol, propiedad que se aprovecha para su separación. La flema se envía a una columna denominada “depuradora”, en la cual utilizando vapor en contacto directo nuevamente, se enriquece con los compuestos más

volátiles contenidos en la flema llevándolos al tope de la columna y en donde son separados del sistema formando lo que se conoce como “alcohol mal gusto”, este último está primordialmente conformado por etanol (es imposible evitar que algo se vaya hacia el tope), aldehído acético y ésteres (acetato de etilo y metilo). La columna depuradora está hecha de cobre, metal que genera reacciones químicas que retienen esencialmente al azufre, presente en los vinos porque lo trae la melaza o por ruptura celular de las levaduras (lisis); el azufre es el principal elemento formador de compuestos de olores desagradables tales como el mercaptano. En el fondo de la columna depuradora se obtiene lo que se conoce como “flema de buen gusto”, que tiene una graduación entre 30-40% v/v y que es enviada a una tercera columna denominada “rectificadora”.

En la columna rectificadora se concentra el etanol hasta un 96% y se separa según su punto de ebullición del furfural y de alcoholes superiores como el propanol, el alcohol amílico y sus isómeros. El metanol se forma en el proceso y acompaña al etanol hasta el final, solo se separan cuando el etanol ha alcanzado el 96% de concentración, en esas condiciones el metanol se vuelve más volátil y por lo tanto, va al tope de la columna; para poder retirarlo, se hace entonces una extracción de uno de los condensadores de cabeza, en tanto el etanol de 96% se lo extrae unos platos más abajo del tope, dando lugar a que se separe completamente del metanol. Básicamente por la parte superior de los condensadores se separa el metanol, a 5 platos del tope se separa el “etanol rectificado” 96% v/v, al 85% de la altura de la columna se separan los alcoholes superiores, al 60% los alcoholes amílicos (aceite fúsel) y por el fondo de la columna sale agua con un bajo contenido en ácidos orgánicos, furfural y otros compuestos que producen una mezcla denominada “flemaza” (Tabacal Agroindustria, 2018).

## 2.2 Generalidades sobre el metanol y los congéneres

Mientras que el etanol es la principal sustancia activa en una bebida alcohólica, son varios otros compuestos, en su mayoría volátiles, los que contribuyen al sabor y aroma de la bebida. Muchos de estos compuestos pueden ser analizados para determinar la fuente y tipo de bebida alcohólica. Los congéneres a menudo no son concluyentes por si solos para determinar la fuente o identidad de una bebida alcohólica, sin embargo en conjunto ayudan de manera muy importante en su determinación. El análisis de congéneres ha sido ampliamente utilizado para determinar los tipos de whisky (scotch, irish y bourbon) incluyendo los adulterados. El parámetro que se utiliza para la identificación de las bebidas alcohólicas, es la cantidad relativa de metanol y congéneres, por ejemplo, cuando la relación de los denominados “aceite fúsel”, que son los isómeros 3-metilbutanol y 2-metilbutanol, es relativamente alta (>5), se sospecha que la bebida no es originaria de la fermentación cereal (Drummer, 2013).

El metanol y los congéneres tienen un metabolismo muy relacionado, su comportamiento dentro del cuerpo humano, así como su tiempo de permanencia dentro de él, son usados como marcadores para regular la incidencia de personas con problemas de alcoholismo. Debido a sus estructuras químicas, los congéneres suelen depositarse en tejidos y en la sangre, en algunos casos el tiempo de residencia puede ser muy largo.

Una característica muy apreciable y que en ocasiones puede dificultar la cuantificación del metanol y los congéneres, es su volatilidad, podrían darse situaciones en las que el tiempo de permanencia en un sistema de análisis no refrigerado, conlleve a una inexacta cuantificación de los analitos en las muestras reales o en los mismos estándares de verificación, de ahí la importancia de implementar un patrón interno como garantía de la conservación de una cuantificación adecuada en el procedimiento de análisis.

### 2.2.1 Metanol

El metanol se encuentra endógenamente en concentraciones entre 1-3 mg/L y principalmente circula por el suero sanguíneo. Este compuesto es uno de los más peligrosos encontrados en las bebidas alcohólicas, su efecto sobre la salud de las personas depende del medio en que se ingiera. El consumo de metanol libre de etanol, puede llevar a aumentar su concentración en sangre a un ritmo entre 0,1-0,5 mg/L.h, que como se ha visto en algunos casos de intoxicación, puede conducir a problemas relacionados con la pérdida de la visión (Drummer, 2013). El metanol, como algunos de los congéneres (alcoholes superiores), compite con el etanol por servir de sustrato a la enzima endógena alcohol deshidrogenasa (ADH), que tiene la función de oxidar el grupo hidroxilo. El metanol tras su oxidación, genera formaldehído que es en realidad, el compuesto tóxico para el organismo; a menudo uno de los tratamientos para evitar la intoxicación por metanol o alcoholes superiores, consiste en la ingesta de mayores cantidades de etanol para elevar la selectividad de la ADH por este último o mediante el suministro de un antídoto específico como el fomepizol (Schaper y Ebbecke, 2017). El origen del metanol en las bebidas alcohólicas, se da por la desmetilación enzimática de las pectinas presentes en el extracto de la caña (Rodríguez-Valencia y Zambrano-Franco, 2011).

Las primeras metodologías para determinar metanol en bebidas alcohólicas, se basaban en métodos colorimétricos. El ICONTEC (2003) mediante la NTC 5159 muestra una metodología colorimétrica; El método consiste en realizar la oxidación controlada del metanol a formaldehído con permanganato de potasio en medio ácido y la posterior medida de la intensidad de color desarrollado en una reacción con ácido cromotrópico. Normalmente en Colombia, esta metodología es una de las más utilizadas cuando no se tiene acceso a la cromatografía. En los últimos años, se han desarrollado varias alternativas para la determinación de metanol en diversas matrices. Hay numerosos reportes que muestran la elaboración de diseños electroquímicos para su medición resultando en el aumento de la sensibilidad analítica (Karimi *et al.*, 2018; Tomassetti *et al.*, 2016; Shishov *et al.*, 2016). Las metodologías cromatográficas, aunque son más útiles para realizar análisis multicomponentes que requieran de la separación de cada compuesto, también han sido utilizadas para la determinación del metanol como único compuesto de interés, Mokhtari y Pourabdollah (2011) determinaron metanol mediante cromatografía de gases, acoplada a la modalidad de inyección SPME (microextracción en fase sólida) en muestras de combustible, aumentando la sensibilidad de los métodos clásicos y disminuyendo los LD y LC. Las propias normas ICONTEC sugieren metodologías cromatográficas además de las clásicas (NTC 4118, 1997), aunque estas normas Colombianas, deben ser actualizadas.

### 2.2.2 Iso-propanol y n-propanol

El isopropanol endógenamente se encuentra en concentraciones menores a 0,1 mg/L, su principal metabolito es la acetona, cuya concentración endógena es entre 1-3 mg/L. En personas que han bebido (entiéndase por este término, la acción de ingerir bebidas alcohólicas) la concentración de isopropanol puede llegar hasta 10 mg/L, aunque normalmente son de aproximadamente 1 mg/L. El mayor riesgo del isopropanol en la salud de los consumidores, es debido a la influencia de su metabolito sobre las personas con cetoacidosis diabética (Drummer, 2013). Se han reportado casos en los que se usa la relación isopropanol:acetona en el suero sanguíneo, para emitir un dictamen de intoxicación por ingestión de isopropanol (Dwyer y Tamama, 2013). Es importante resaltar que los riesgos del isopropanol, solo son significativos cuando este se metaboliza más selectivamente que el etanol y cuando los niveles de exposición son muy altos, lo cual sucede en casos muy extraños.

El isopropanol es clasificado dentro de los congéneres, como un “alcohol superior”, la metodología clásica recomendada por el ICONTEC (2007) mediante la NTC 5157 para el análisis de alcoholes superiores, indica que este grupo de congéneres reacciona con el p-dimetil-amino-benzaldehído en presencia de ácido sulfúrico, el compuesto púrpura que resulta de la reacción, se mide colorimétricamente por espectrofotometría UV-Vis.

La determinación del isopropanol, como varios de los otros alcoholes superiores, ha sido llevada a cabo por algunos los investigadores mediante volamperometría cíclica (van Drunen *et al.*, 2014) y métodos potenciométricos alternos (Vermorel *et al.*, 2017).

El n-propanol es otro de los congéneres en el grupo de alcoholes superiores, normalmente no está presente en el suero sanguíneo, aunque su tiempo de permanencia cuando se ingiere mediante las bebidas alcohólicas, es mayor que su isómero, el 2-propanol (suele ser de 1-3 horas). Es uno de los congéneres que se encuentra más a menudo en las bebidas alcohólicas, su contenido varía entre valores cercanos a cero (vodka y ginebra) hasta valores que exceden los 1000 mg/L (algunos brandis), con licores como la cerveza suele estar en cantidades entre 10-30 mg/L (Drummer, 2013).

### **2.2.3 Iso-butanol, sec-butanol, n-butanol**

El iso-butanol junto a sus isómeros n-butanol y sec-butanol, también componen el grupo de los alcoholes superiores, están presentes en mayores cantidades en bebidas tipo brandy de fruta. El metabolismo de estos alcoholes conduce a la producción de aldehídos y ácidos butíricos. No se han evidenciado hallazgos de niveles que representen riesgo para la salud humana, sin embargo su influencia sobre las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas es de mucha apreciación. Estos alcoholes han sido encontrados en procesos de putrefacción ejercidos por bacterias y pueden producir olores desagradables en las bebidas (Kostik *et al.*, 2013). El proceso de fermentación dependiendo de las levaduras que se utilicen, puede producir butanol en menor cantidad que los otros congéneres, debido a la tolerancia que tienen algunas cepas microbianas por estos compuestos (Patakova, *et al.*, 2017), de hecho, actualmente la producción industrial de butanol no se lleva a cabo por fermentación sino por síntesis petroquímica (Sang-Hyun *et al.*, 2016).

El análisis de estos alcoholes, aparte de poderse hacer mediante cromatografía de gases y por métodos colorimétricos, puede desarrollarse mediante cromatografía líquida de alta resolución (Medina, 2013), que a la par de la cromatografía de gases, son las herramientas más eficientes para la determinación de analitos en muestras multicomponentes.

### **2.2.4 3-metilbutanol y 2-metilbutanol**

A menudo denominados alcoholes isoamílico y amílico activo respectivamente, estos alcoholes están presentes en la mayoría de las bebidas alcohólicas, sobre todo los brandis de fruta. En muchas de las bebidas alcohólicas, se demanda un contenido mínimo de estos alcoholes, los cuales brindan a la bebida el aroma y carácter esencial, sin embargo el alcohol amílico en concentraciones muy altas, representa potencial tóxico. Los alcoholes amílicos constituyen cuantitativamente la parte más grande de alcoholes superiores y son considerados como medida para predecir el carácter sensorial del producto destilado (Soufleros, Mygdalia y Natskoulis, 2004).

### 2.2.5 Acetaldehído

Es originado durante la fermentación del material de partida y aumenta su concentración con la edad de la bebida. Es considerado principalmente como el resultado de la oxidación espontánea o microbiana del alcohol etílico (Soufleros, Mygdalia y Natskoulis, 2004).

El acetaldehído es considerado un compuesto que otorga potente sabor a jugos de fruta y bebidas alcohólicas, su contenido no solo procede de la acción de fermentación de azúcares por acción microbiológica, sino también en gran parte por el metabolismo de aminoácidos como la alanina, presentes en la materia prima; es excretado principalmente por las levaduras en la etapa de crecimiento y puede ser recatabolizado, de manera que su contenido en las bebidas es muy variable. Es altamente volátil y posee un irritante olor picante, pero en solución otorga un placentero aroma frutal; es tóxico para el hombre, principalmente para los músculos cardíacos y células del hígado (Geroyiannaki, 2007). En algunos estudios *in vitro* sobre ratones, ha demostrado ser un potente supresor para la liberación de testosterona, en algunos casos por encima del etanol (Quintans *et al.*, 2013).

Para el acetaldehído que es el congénere más volátil de los estudiados en este trabajo, la cromatografía de gases ha sido desde su creación, la más importante herramienta para su cuantificación. Se han implementado novedosas técnicas de muestreo y de inyección acopladas a la cromatografía de gases, un ejemplo lo evidencian Veríssimo *et al.* (2016) en un trabajo donde aplican la microextracción en fase sólida y la inyección por headspace para determinar acetaldehído en cidra. Métodos alternativos como los fluorimétricos también han mostrado buenos resultados (Zachut, Shapiro y Silanikove, 2016).

La metodología clásica para la determinación de acetaldehído en bebidas alcohólicas sugerida por el ICONTEC (2006) mediante la NTC 242, aprovecha las propiedades redox del acetaldehído para medir su contenido por yodometría, tras la adición de bisulfito de sodio.

En los productos terminados se han desarrollado tratamientos para reducir el contenido de acetaldehído cuando sea necesario, es decir cuando sobrepase los niveles permisibles por normativas de legislación y regulación, estos tratamientos son basados en procesos de agitación que aprovechan la volatilidad de este congénere.

### 2.2.6 Etilacetato

Tiene un importante efecto en las características organolépticas de los destilados, así como otro tipo de ésteres etílicos en menor proporción. La presencia de este compuesto genera un placentero aroma de propiedades frutales los cuales se tornan vinagrosos en concentraciones alrededor de 150 mg/L añadiendo notas de deterioro sobre la bebida (Apostolopoulou *et al.*, 2005). En concentraciones adecuadas, confiere a la bebida un placentero sabor. Contenidos altos de este compuesto son indicativos de largos tiempos en el almacenamiento del material de partida y de deterioro por acción bacteriana (Dragone *et al.*, 2009).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene un conjunto de enzimas que producen etilacetato con buenos rendimientos, sin embargo se ha mostrado que algunas de estas enzimas actúan mejor de manera individual en la producción de este compuesto (Kruis *et al.*, 107). Para el etilacetato se ha reportado una particularidad bastante contradictoria, su capacidad inhibitoria sobre la actividad de las enzimas presentes en la *Saccharomyces cerevisiae* (Oro *et al.*, 2018) sugiriendo que el proceso de fermentación etanólica sería más eficaz si la producción de etilacetato se viera disminuida, ya que a medida que este compuesto se va generando, la

actividad enzimática se va inhibiendo, por lo cual sería importante realizar un estudio de la relación etilacetato/actividad enzimática durante la fermentación.

Los ésteres son cuantificados clásicamente según la metodología propuesta por el ICONTEC (2003) a través de la NTC 196 mediante volumetría ácido-base, se realiza una reacción de saponificación sobre un determinado conjunto de ésteres en bebidas alcohólicas, que se lleva a cabo por acción del hidróxido de sodio. Hay más de un inconveniente con esta metodología, entre el gasto de reactivos agresivos con el medio ambiente y la demanda de altos tiempos de análisis, también está la falta de selectividad. En las bebidas alcohólicas, el etilacetato aunque es el éster que más abunda, no es el único, también hay un grupo de ésteres de cadena suficientemente larga para identificarse como ácidos grasos y que claramente también son objetivo de la reacción de saponificación.

### **2.2.7 Metilacetato**

Hay varios estudios que muestran el análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas, pero la mayoría de ellos ignoran totalmente al metilacetato. Este congénere es un éster de bajo peso molecular, muy volátil y que también se produce durante la fermentación de azúcares.

Es utilizado industrialmente como saborizante sintético; sus vapores son medianamente irritantes y en altas concentraciones puede conllevar a una depresión en el sistema nervioso central, exposiciones a sus vapores que sobrepasen aproximadamente los 45 minutos, pueden producir dolor de cabeza y somnolencia de hasta 6 horas (Toxicology Data Network, 2015).

### **2.2.8 Furfural**

Este compuesto no está clasificado dentro del grupo de aldehídos según la NTC 620 (ICONTEC, 2001), la justificación se basa en fines prácticos, ya que en muchas bebidas se espera la eliminación total de este congénere en el proceso de destilación, a diferencia del acetaldehído que es permitido en ciertos niveles de concentración; en bebidas alcohólicas no suele sobrepasar los 0,1 mg/L.

Este compuesto es formado durante la destilación debido a la degradación de azúcares pentosas fermentables, causada por calentamiento en condiciones ácidas y por reacciones de Maillard (Dragone *et al.*, 2009). Altas cantidades de furfural pueden ser atribuidas a altas cantidades de azúcares pentosas residuales, debido a condiciones no favorables en el proceso de fermentación (Apostolopoulou *et al.*, 2005). Su olor es amargo y tiene carácter tóxico.

Aunque se espere que las bebidas alcohólicas no tengan contenido alguno de furfural, es necesario el control de calidad sobre la ausencia de este compuesto, pequeñas cantidades de este compuesto pueden afectar gravemente los resultados del producto terminado; el furfural es un compuesto de color marrón, a diferencia del resto de los congéneres que son incoloros, por lo que el efecto de este compuesto sobre licores claros (incoloros) puede deteriorar la calidad que se percibe en dicho licor.

El furfural es determinado cualitativamente de forma clásica según la NTC 269 (ICONTEC, 2005) mediante la adición de anilina sobre la muestra, la presencia de este compuesto desarrolla coloración que se compara con un blanco.

Novedosos y rápidos métodos se han implementado para el análisis de furfural en bebidas alcohólicas, Milani *et al.* (2017) mostraron un método colorimétrico para cuantificar en simultáneo furfural e hidroximetilfurfural en muestras de licor de caña de azúcar, concluyendo

que su método resultaba más barato, rápido y amigable con el medio ambiente, que los métodos cromatográficos y los clásicos. Madani-Tonekaboni, Kamankesh y Mohammadi (2015) mostraron las ventajas de determinar furfural e hidroximetilfurfural mediante cromatografía líquida de alta resolución, optimizando un método acoplado a microextracción dispersiva líquido-líquido para analizar muestras de fórmula de bebés. Es importante recalcar nuevamente, la eficiencia de los análisis cromatográficos para muestras multicomponentes. La tabla 1 muestra algunas de las características más importantes en el desarrollo de este trabajo del metanol y los congéneres, así como su agrupación de acuerdo a las normativas nacionales.

**Tabla 1.** Características y agrupación del metanol y congéneres de acuerdo a su familia química

Grupo	Analito	Características fisicoquímicas
Alcoholes superiores	i-propanol, n-propanol, s-butanol, i-butanol, n-butanol, 3-metilbutanol y 2-metilbutanol	Polaridad media, volatilidad baja, toxicidad baja
Ésteres	Etilacetato y metilacetato	Polaridad baja, volatilidad alta, toxicidad media
Aldehídos	Acetaldehído	Polaridad media, volatilidad alta, toxicidad baja
Furfural	Furfural	Polaridad baja, volatilidad baja, toxicidad alta
Metanol	Metanol	Polaridad alta, volatilidad alta, toxicidad alta

## 2.3 Control y regulación de metanol y congéneres en alcohol y bebidas alcohólicas

La regulación del metanol y congéneres varía de tanto en tanto, de acuerdo al tipo de bebida alcohólica en que se presenten, normalmente sus niveles en bebidas oscuras son mayores que en bebidas claras. Es importante tener dos tipos de regulación en cuenta: el reglamento de la Comunidad Europea (CE, 1989), que es el más aceptado internacionalmente debido por supuesto, al alto consumo de bebidas alcohólicas en este continente, y al reglamento Colombiano que corresponde al nacional indicado por la NTC 620 (ICONTEC, 2001).

### 2.3.1 Reglamento de la Comunidad Europea (CE)

La comunidad Europea, define a un conjunto de sustancias volátiles, diferentes del etanol y el metanol, que se forman durante el proceso de fermentación, la destilación y el envejecimiento de bebidas espirituosas. Las bebidas espirituosas en Europa, son las que se producen a partir de la fermentación de materias primas agrícolas (uva, cereales, frutos secos, remolacha, fruta, caña, entre otras) y cuyo contenido de etanol es mayor al 15% v/v. Se tratan como bebidas espirituosas a productos como el brandy, el whisky, el ron, la ginebra, el vodka, entre otros. La definición precisa según la CE (1989) es que la bebida espirituosa es la bebida alcohólica destinada al consumo humano, con caracteres organolépticos especiales, con una graduación mínima de 15% v/v, obtenida por destilación, en presencia o no de aromas, de productos naturales fermentados, o por maceración de sustancias vegetales, con adición o no de aromas, azúcares, otros edulcorantes, u otros productos agrícolas. La tabla 2 muestra los contenidos de volátiles que son permitidos según este reglamento y de acuerdo al tipo de bebida espirituosa que sea; es importante resaltar que el alcohol etílico de origen agrícola es uno de los más regulados y los contenidos de volátiles deben ser de: 15 mg/L de acidez total expresada como ácido acético, 13 mg/L de ésteres expresados como etilacetato, 5 mg/L de aldehídos expresados como acetaldehído, 5 mg/L de alcoholes superiores expresados como i-butanol, 500 mg/L de

metanol, 15 mg/L de extracto seco, 1 mg/L de bases nitrogenadas volátiles expresadas como nitrógeno y el furfural debe ser imperceptible.

**Tabla 2.** Características de algunas bebidas espirituosas según la CE

Bebida	Obtención	G.A. del destilado	G.A. mínima	Añejado	Volátiles (mg/L) <sup>a</sup>	Metanol (mg/L)
Ron	Fermentación alcohólica y destilación de melazas o jarabes procedentes del jugo de caña	< 96,0%	37,5%	N. E.	≥ 2250	N. E.
Whisky	Destilación de mosto de cereales, sacarificado por la diastasa de malta, con o sin otras enzimas naturales	< 94,8%	40,0%	≥ 3 años en toneles de madera con una capacidad menor o igual a 700 L	N. E.	N. E.
Aguardiente de vino	Destilación o redestilación de vino	< 86,0%	40,0%	N. E.	≥ 1250	≤ 2000
Brandy	Aguardiente de vino destilado o no destilado	< 50% en el producto acabado	36,0%	≥ 1 año en recipientes de roble o 6 meses si la capacidad del recipiente es menor a 1000 L	≥ 1250	≤ 2000
Aguardiente de orujo	Orujos de uva fermentados y destilados	< 86,0%	40,0%	N. E.	≥ 1400	≤ 10000
Aguardiente de fruta	Fermentación alcohólica y destilación de un fruto o mosto de fruto	< 86,0%	40,0%	N. E.	≥ 2000	≤ 10000
Bebida anisada	Aromatización de un alcohol etílico de origen agrícola con extractos naturales de anís	N. E.	15,0%	N. E.	N. E.	N. E.

G.A.: Graduación alcohólica o grado alcohólico

N.E.: No especifica la norma

<sup>a</sup>Los volátiles son considerados como la suma total de: ácidos volátiles expresados como ácido acético, aldehídos expresados como acetaldehído, alcoholes superiores expresados como i-butanol, ésteres expresados como etilacetato, furfural, extracto seco y bases nitrogenadas volátiles expresadas como nitrógeno.

### 2.3.2 Norma Técnica Colombiana (NTC)

Diferentes normas técnicas han sido estipuladas por el ICONTEC para cada una de las bebidas alcohólicas, de manera que para que una bebida pueda ser comercializada bajo un nombre específico (ron, vodka, ginebra, aguardiente, etc.) debe cumplir con dichas normas. Las siguientes definiciones son establecidas por la NTC 222 (ICONTEC, 1996), de las materias utilizadas en la elaboración de bebidas alcohólicas.

Una bebida alcohólica es un producto obtenido por procesos de fermentación alcohólica, destilación de los productos de la fermentación o por mezcla de las sustancias obtenidas por tales procesos, adicionado o no, de diversos ingredientes y no se le reconocen propiedades terapéuticas. Debe ser apta para el consumo humano.

Destilación especial es el proceso efectuado con rectificación parcial para obtener un destilado con determinadas características que generalmente acusen su origen.

Añejamiento es el proceso que consiste en dejar desarrollar naturalmente en recipientes apropiados, ciertas reacciones químicas que confieren a la bebida cualidades organolépticas particulares del producto.

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

Mosto es todo sustrato fermentable, obtenido a partir de frutas, cereales o de otros productos naturales; ricos en carbohidratos susceptibles de transformarse en etanol, mediante procesos fisicoquímicos o bioquímicos. Se le designará por la frase “mosto de...” seguida del nombre de la fruta o sustancia de la cual proviene.

Alcohol puro o extraneutro es aquél que ha sido sometido a una operación de rectificación hasta obtener un producto de 96° alcoholimétricos como mínimo cuyo contenido total de congéneres es inferior o igual a 35 mg/dm<sup>3</sup> de alcohol anhidro.

Tafia es el aguardiente de caña que no ha sido sometido a operaciones de rectificación, cuyo contenido total de congéneres es mayor de 150 mg/dm<sup>3</sup> de alcohol anhidro, y cuya destilación se efectúa entre 70 y 94° alcoholimétricos.

Aguardiente es el producto proveniente de la destilación de mostos fermentados. Se caracteriza por conservar un aroma y un gusto particular inherentes a la sustancia sometida a fermentación y destilación. Se le designará por la frase “aguardiente de...”, seguida del nombre de la fruta o material del cual proviene; también se puede denominar por un nombre específico.

La tabla 3 muestra las características relacionadas con el contenido de congéneres en algunas bebidas alcohólicas. Es importante además citar la NTC 620 (ICONTEC, 2001) donde se indica que el alcohol rectificado extraneutro usado en la elaboración de bebidas alcohólicas debe contener un límite máximo de metanol de 50 mg/L de alcohol anhidro y de congéneres de 2, 25, y 5 mg/L de alcohol anhidro, de aldehídos, ésteres y alcoholes superiores expresados como se muestra en el apartado <sup>(a)</sup>, el furfural no debe ser detectable.

La tafia que ha pasado por un proceso de destilación especial, debe contener valores máximos de congéneres de 5, 200, 1000 y 10000 mg/L de alcohol anhidro de furfural, aldehídos (expresados como acetaldehído), ésteres (expresados como etilacetato) y alcoholes superiores (expresados como alcohol amílico) respectivamente, el contenido máximo de metanol debe ser de 100 mg/L de alcohol anhidro (ICONTEC, 2004).

**Tabla 3.** Características de algunas bebidas alcohólicas según normativas nacionales

Bebida	Obtención	G.A.	añejado	Congéneres (mg/L)	Metanol (mg/L)	NTC
Ron	Aguardiente sometido a destilación especial de mostos fermentados del zumo de la caña de azúcar	>35%	> 6 meses	>250	<300	278
Ginebra	Aguardiente sometido a destilación y rectificación de un mosto fermentado, posteriormente redestilado en presencia de bayas de enebro ( <i>Juniperus Communis</i> ) y otras especies aromáticas	>39%	No	<120	<100	300
Vodka	Alcohol etílico extraneutro o neutro posteriormente destilado, o tratado equivalentemente para que tenga por efecto atenuar selectivamente los caracteres organolépticos inherentes a las materias primas empleadas, es aromatizado.	>40%	No, pero si saborizado	<2500	<100	305
Aguardiente de caña	Destilación especial de mostos de zumos de caña de azúcar	>38%	No	2000-6500	<300	410
Anís o anisado	Destilación alcohólica en presencia de semillas de anís con, o sin otras sustancias aromáticas o también se obtiene mezclando alcohol rectificado extraneutro o neutro con aceites o extractos de anís, seguido o no, de destilación y posterior dilución hasta el G.A. correspondiente.	>29%	No	<80	<100	411
Brandy	Destilación especial a menos de 94,8% (G.A.) a partir de vinos	>35%	>1 año o 6 meses si la capacidad del tonel es menor a 1000 L	>1000	<1000	634
Whisky	Destilación especial de un mosto fabricado con malta, adicionado o no, de otros granos	>40%	>3 años	>1500	<300	917

G.A. Grado alcohólico métrico

<sup>(a)</sup>Considerados como la suma total de furfural, acidez volátil expresada como ácido acético, aldehídos expresados como acetaldehído, alcoholes superiores expresados como propanol y ésteres expresados como etilacetato.

El ron particularmente según las especificaciones de la NTC 278 (ICONTEC, 2005) debe contener valores máximos de congéneres de 10, 400, 10000 y 3000 mg/L de alcohol anhidro de furfural, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores respectivamente, expresados de la misma forma que la tafia, el contenido máximo de metanol debe ser de 300 mg/L de alcohol anhidro.

En Colombia la NTC que define a las bebidas alcohólicas difiere del nombre comercial de algunas de ellas; el aguardiente por ejemplo, no está reñido a su definición técnica, en realidad se comercializa bajo el nombre de aguardiente, siendo técnicamente un anís o anisado.

## 2.4 Metanol y congéneres en bebidas alcohólicas

En la tabla 4 se muestra el contenido de metanol y algunos de los congéneres (n-propanol, n-butanol, s-butanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol) encontrados en un número de muestras considerablemente grande de bebidas alcohólicas (Drummer, 2013), están expresados como mg/L de alcohol anhidro y muestras el promedio de “n” número de muestras más o menos ( $\pm$ ) la desviación estándar de las mismas y/o el rango de concentraciones encontrado.

**Tabla 4.** Contenido en mg/L alcohol anhidro de metanol y algunos congéneres en bebidas alcohólicas

Clase de bebida	n	MeOH	nprOH	nbOH	sbOH	ibuOH	2metbOH	3metbOH
Cerveza, f.f	545	7 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3	0	0	13 $\pm$ 4	13 $\pm$ 3	52 $\pm$ 12
Cerveza, t.f	102	1-19	10-73	0	0	9-90	10-49	37-124
Vino rojo	282	104 $\pm$ 30	30 $\pm$ 7	0-7	0-1	47 $\pm$ 15	33 $\pm$ 6	137 $\pm$ 26
Vino blanco	460	29 $\pm$ 16	31 $\pm$ 8	0-8	0	56 $\pm$ 18	27 $\pm$ 6	112 $\pm$ 15
Champagne	53	16 $\pm$ 8	31 $\pm$ 5	0-9	0	53 $\pm$ 15	30 $\pm$ 7	126 $\pm$ 28
Brandy de uvas	25	272 $\pm$ 76	130 $\pm$ 22	0-4	1-18	252 $\pm$ 38	77-186	482-961
Escocés de malta	23	159 $\pm$ 9	131 $\pm$ 16	0	0	376 $\pm$ 34	118 $\pm$ 10	486 $\pm$ 40
Whiskey Irlandés	6	6-110	170-205	0	0	284-413	72-89	288-388
US Whiskey	22	196-328	50-193	0	0	388 $\pm$ 99	271 $\pm$ 53	1059 $\pm$ 188
Whisky Canadiense	8	70-90	13-82	0	0	20-50	26-55	102-197
Gin	14	12-1359	0-885	0-1	0	0-7	0-19	0-53
Vodka	27	1-170	0-16	0	0	0	0	0

f.f. Fondo del fermentado, t.p. Tope del fermentado. n: Tamaño muestral.

MeOH: Metanol, nprOH: n-propanol, nbOH: n-butanol, sbuOH: s-butanol, ibuOH: i-butanol, 3metbOH: 3-metilbutanol, 2metbuOH: 2-metilbutanol.

El contenido de metanol y congéneres es una parte fundamental en las características organolépticas del producto terminado, es lo que hace de cada tipo de bebida y de cada marca específica, un producto único y diferente de los demás.

Dejando de lado las características que confieren a las bebidas alcohólicas, se ha demostrado que sin hablar de toxicidad aguda, los congéneres potencializan directamente un efecto secundario sobre el organismo al día siguiente de detener la ingesta de bebidas alcohólicas, este efecto comúnmente denominado “resaca”, característico del consumo de bebidas alcohólicas, ha mostrado ser más marcado después de ingerir bebidas con contenidos altos de congéneres como el Bourbon versus bebidas con bajos niveles de congéneres como el vodka (Rohsenow *et al.*, 2010) y es el principal resultado sobre la salud de las personas, incluye dolor de cabeza,

mareos, desordenes en el sueño, y disminución en los reflejos y la capacidad cognitiva temporal de las personas.

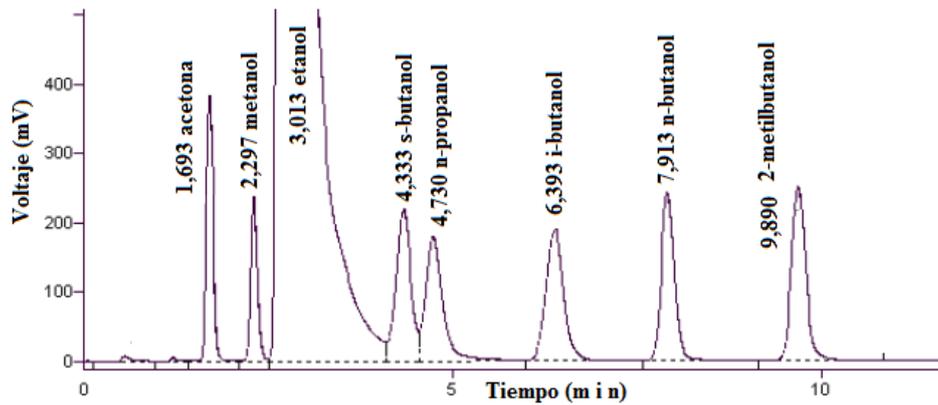
Estos efectos son también, y en principal medida, debido al metabolismo del etanol y su acción sobre la inhibición del sistema nervioso central que es la generadora del estado de ebriedad de los consumidores. El metabolismo del etanol puede darse mediante tres vías (vía de la enzima alcohol deshidrogenasa, vía del sistema microsomal de oxidación y vía de las catalasas) y la vía que tome depende de los individuos, de acuerdo a sus características enzimáticas, por ejemplo en alcohólicos crónicos y en niños lactantes, la vía principal de metabolizar el etanol no es mediante la enzima alcohol deshidrogenasa sino mediante el sistema microsomal de oxidación, que produce una depuración acelerada del alcohol (debido a presencia de acetiladores lentos en su organismo) (Téllez y Cote, 2006).

Los efectos del etanol sobre el organismo son explicados por múltiples mecanismos, ejerce acción sobre el neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico), aumentando la conductancia del ion cloro, mecanismo responsable de la depresión primaria en la intoxicación aguda. La aparente estimulación psíquica inicial se produce por la actividad incoordinada de diversas partes del encéfalo y por la depresión de los mecanismos inhibidores del control por acción de neuronas GABAérgicas; Reacciona con otros neurotransmisores cerebrales como dopamina, norepinefrina y serotonina. Disminuye el recambio de serotonina en el sistema nervioso central llevando a diferentes respuestas clínico-neurológicas (Téllez y Cote, 2006).

## **2.5 Metodologías cromatográficas para determinar metanol y congéneres**

Ya se han citado algunos trabajos donde se implementan las metodologías cromatográficas para determinar metanol y algunos de los congéneres del etanol, en conjunto o por separado. Algunos de los que ya se han mencionado en este marco teórico, han sido los trabajos de Soufleros *et al.* (2004) en la caracterización y evaluación de la seguridad del destilado de una fruta tradicional griega (Mouro) mediante el análisis de compuestos que otorgan sabor a la bebida y aquellos que son minerales; el trabajo de Rodríguez-Valencia y Zambrano-Franco (2011) en la producción de alcohol a partir de mucílago de café, donde caracterizan el alcohol obtenido mediante la identificación de algunos compuestos volátiles; el trabajo de Kostik *et al.* (2013) en el análisis de algunos congéneres volátiles en diferentes tipos de bebidas espirituosas de fruta mediante cromatografía de gases; el trabajo de Drummer (2013) en el análisis de congéneres y las fuentes del alcohol. Además de los citados en este trabajo, hay otros que han dedicado sus esfuerzos a implementar la cromatografía y sobre todo, la cromatografía de gases, en el análisis de metanol y congéneres del etanol en diferentes matrices, Jung *et al.* (2013) en su trabajo de establecer un método para determinar congéneres volátiles en bebidas alcohólicas, obtuvo el cromatograma que se observa en la figura 1.

Con el transcurso del tiempo no solo las investigaciones, sino también el trabajo de diferentes casas comerciales como AGILENT TECHNOLOGIES®, SUPELCO®, THERMO FISHER SCIENTIFIC®, entre otras, enfocan sus objetivos en desarrollar mejoras sobre la técnica clásica: mejores fases estacionarias, mejores técnicas de inyección, mejores y más reproducibles resultados, y de esa manera perfeccionar dicha técnica en cuanto sea posible.



**Figura 1.** Cromatograma obtenido por Jung *et al.* (2013) en la separación de metanol y algunos congéneres

Jung *et al.* (2013) expresa que para obtener una buena resolución en los cromatogramas, es fundamental establecer buenas condiciones cromatográficas, entre las cuales se destacan el modo de inyección, la rampa de temperaturas en el horno y/o rampa de gas de arrastre y el tipo de columna que se utilice. Con la implementación de nuevas fases estacionarias como las ultra inertes (UI) por ejemplo, se resuelven muchos de los problemas de estabilidad de la anterior gamma de columnas para cromatografía de gases (AGILENT, 2012), se disminuye el sangrado de la fase estacionaria y se mejora el comportamiento de la línea base en los cromatogramas, se aumenta el rango de temperatura de trabajo y el tiempo de vida útil de las columnas, se disminuye el ruido en los resultados haciéndolos más sensibles y más precisos.

La columna que se utilice, así como la rampa de temperaturas que se programa en el horno, son probablemente los factores más influyentes sobre la resolución ( $R_{AB}$ ), entendiéndose por este término a la separación relativa de un pico cromatográfico B respecto a otro de referencia A, su definición puede ser expresada por la ecuación 1:

$$R_{AB} = 2 \frac{|d_R(B) - d_R(A)|}{|w(B) - w(A)|} \quad (Ec. 1)$$

Donde  $d_R(A)$  y  $d_R(B)$  son las distancias de retención (tiempo o volumen) de cada compuesto eluido y  $w(A)$  y  $w(B)$  son los respectivos anchos de pico (IUPAC, 2012).

La respuesta de un par de picos cromatográficos puede ser clasificada de acuerdo a su valor de resolución obtenido con la ecuación 1, en general se considera que una resolución mayor a 1,0 es aceptable (Spaak *et al.* 2016), en este valor los picos se solapan un 4%, sin embargo, una resolución analítica (mayor a 1,5) se prefiere para fines cuantitativos ya que su solapamiento es solo del 0,3%.

Las columnas más utilizadas hoy por hoy para la cromatografía de gases, son las capilares PLOT o columnas tubulares abiertas de capa porosa, y en menor proporción las columnas capilares WCOT o columnas tubulares abiertas de pared recubierta. Estos dos tipos de columnas, como su nombre lo indica, poseen la fase estacionaria sobre la pared de un tubo abierto de fibra de vidrio, este tubo se caracteriza por tener gran longitud (normalmente mayor a 15 metros) y pequeño diámetro interno (a menudo menor a 2,5 mm). Las características adicionales al tipo de fase estacionaria, como la longitud de la columna, el grosor de la fase estacionaria y el tamaño de partícula de la misma, mejoran notablemente la calidad de los resultados. Las más utilizadas para el análisis de metanol y otros alcoholes son las de mayor polaridad, cuya fase estacionaria es 100% polietilenglicol (Soufleros *et al.*, 2004; Rodríguez-

Valencia y Zambrano-Franco, 2011; Kostik *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2013), los ésteres a menudo son analizados con columnas de menor polaridad a base 100% de dimetilpolisiloxano o con modificaciones de 5% fenilmetilpolisiloxano (Kamatou y Viljoen, 2017; Mani-Varnosfaderani, Kanginejad y Yamini, 2018; Bai *et al.*, 2018), el metanol como otros solventes cuya principal característica es la volatilidad y el bajo peso molecular, han mostrado buenas resoluciones cuando se analizan con dimetilpolisiloxano modificado con 6% de cianopropil-fenil (Tian y Rustum, 2016; Barhdadi *et al.*, 2017; Dubois *et al.*, 2018).

Una separación cromatográfica se optimiza variando las condiciones experimentales hasta que los componentes de una mezcla se separen completamente (buena resolución) en el menor tiempo posible, la condición que más afecta la separación es el tipo de columna que se utilice, debido a la diferente afinidad que pueda presentar con los componentes, la segunda condición que más afecta la separación cromatográfica es la rampa de temperatura que se programe en el horno, y la tercer condición es el flujo de gas portador que se utilice, esto teniendo en cuenta la modalidad más común de cromatografía de gases: temperatura del horno en rampa y flujo de gas portador constante.

Cuando se intenta descubrir qué factores son importantes sobre una respuesta y optimizar dicha respuesta, el diseño de experimentos (DDE) ofrece una herramienta estadística muy importante; un DDE identifica los factores significativamente importantes y optimiza una respuesta en base a esos factores (Coscollà *et al.*, 2014). En la cromatografía de gases dada la influencia que ejerce la rampa de temperaturas en el horno y el flujo de gas portador sobre la resolución de los picos, y en más medida sobre el tiempo de análisis, un DDE sería adecuado para optimizar la metodología. El DDE es la forma mejorada de los ensayos uno a uno o ensayo y error que se realizaban tradicionalmente, donde se iban cambiando los factores y analizando la respuesta individual de los experimentos, esta forma es tediosa y normalmente consume más experimentos de los necesarios.

## **2.6 Validación de metodologías analíticas**

El objetivo de la validación de una metodología analítico es demostrar que es adecuada para un propósito definido. Hay más de una forma de determinar los parámetros necesarios para validar procedimientos analíticos, una de las más aceptadas es la guía para validación de metodologías analíticas de la conferencia internacional de armonización (ICH por sus siglas en inglés) (1996), que corresponde a un documento que aunque no limita dichos parámetros, ofrece un modo uniforme de realizar estos procedimientos, incluye decisiones de la Comunidad Europea, de normativas Estadounidenses y normativas técnicas de Japón respecto a este tema. Otra guía para validaciones en muestras de drogas y alimentos aceptada a nivel internacional, es la guía para la industria de la administración de drogas y alimentos (FDA por sus siglas en inglés) (2001). Los parámetros que se determinan son la especificidad o selectividad, la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación y la linealidad., características de los métodos que se describen a continuación.

### **2.6.1 Especificidad**

Es la habilidad de analizar un compuesto inequívocamente en presencia de otros componentes que pudieran estar presentes, típicamente esto incluye impurezas, degradantes, efectos de la matriz, entre otros. En cromatografía de gases la utilización de blancos de análisis permite identificar señales “fantasma”, que es el nombre que se le da a algún pico que pueda mostrarse en el cromatograma y que sea independiente de la muestra analizada, es importante que estas señales no interfieran en los tiempos de retención en los que aparecen los analitos.

### 2.6.2 Exactitud

Es la cercanía de la media de los resultados obtenidos respecto al dato considerado como el “valor real de concentración, bajo cierto valor de incertidumbre”. La exactitud puede ser medida preparando tres niveles de concentración conocida entre el rango de concentraciones esperados en la muestra, estos estándares se analizan por el método analítico y se comparan con el dato esperado. El valor medio obtenido debería encontrarse dentro del 15% de error relativo (%Error) respecto al valor real, excepto para el límite de cuantificación que puede tener un error no mayor al 20% (Monteiro *et al.*, 2016).

### 2.6.3 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre sí de una serie de medidas obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas; si no es posible conseguir un grupo conjunto de muestras homogéneas, se realizan soluciones simuladas preparadas artificialmente, que corresponden a estándares de referencia con o sin una matriz definida. La precisión usualmente es expresada en términos de coeficiente de variación (CV), desviación estándar ( $s$ ) o varianza ( $s^2$ ); puede ser medida en tres niveles: repetibilidad o intra-day, se refiere a la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo, la precisión intermedia o inter-day que se refiere a la precisión obtenida en alteraciones dentro del mismo laboratorio como por ejemplo, días diferentes, operarios diferentes y condiciones fisicoquímicas diferentes, por último la precisión puede expresarse como reproducibilidad que indica la precisión obtenida bajo intervalos largos de tiempo o en algunos casos, alterando variables del análisis como el laboratorio (que puede ser expresado como un examen de aptitud frente al método), el equipo o el analista (que puede ser expresado como la robustez del método).

### 2.6.4 Límite de detección (LD)

Es la cantidad más baja de analito que puede ser identificada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. La forma más común de establecer el LD es el método IUPAC, el cual indica que un valor de señal/ruido (S/N) igual a 3, corresponde al valor de concentración dado para el LD (Currie, 1995). Otros métodos para su determinación incluyen la definición visual del límite y la utilización de la ecuación 2, definiendo el LD como como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco,  $y_b$ , más tres veces la desviación estándar del blanco  $s_b$  (Miller y Miller, 2002).

$$LD = y_b + 3s_b \quad (Ec. 2)$$

La señal del blanco puede ser aproximada al valor del intercepto obtenido en la curva de calibración. El valor de la desviación estándar del blanco puede ser aproximado al estadístico  $S_{y/x}$  que estima los errores aleatorios en la dirección  $y$  (dirección del área) y está dado por la ecuación 3.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (Ec. 3)$$

Donde  $y_i$  indica el valor del área obtenida en cada uno de los puntos de la recta de calibración y  $\hat{y}_i$  indica el valor de área obtenido de acuerdo a la recta de tendencia que se obtiene en la curva de calibración realizada.

### 2.6.5 Límite de cuantificación (LC)

Es la cantidad más baja de analito que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud aceptable, normalmente CV menor al 20% y %Error menor al 20% respectivamente (Monteiro *et al.*, 2016). El método IUPAC para determinar este parámetro indica que un valor S/N=10 es el indicado para reportar el LC, el método estadístico propone que el LC debe proporcionar una señal igual a la del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco (en algunas determinaciones, una señal 5 veces más grande que la del blanco también es aceptada).

### 2.6.6 Linealidad

Es la capacidad (dentro de un intervalo de concentraciones definido) para obtener respuestas directamente proporcionales a la concentración del analito. Para determinar hasta qué punto un método analítico sigue siendo lineal, a menudo se analizan soluciones estándar de concentración progresivamente mayores hasta encontrar un punto en el cual se pierde este comportamiento, este rango corresponde al rango dinámico.

## 2.7 Análisis estadístico

El apartado 2.7 fue extraído de Miller y Miller (2002) quienes indican que el análisis estadístico o tratamiento de uno o más conjuntos de datos, brinda la posibilidad de compararlos entre ellos de diferentes formas, determinando así la existencia de alguna diferencia entre ellos y si dicha diferencia es o no significativa. Para decidir si la diferencia que pudiera existir entre un grupo de datos es debida a errores aleatorios (error residual después de corregir los errores sistemáticos que son los que afectan siempre la medida en el mismo sentido y magnitud), se puede aplicar una prueba estadística denominada contraste de significación.

### 2.7.1 Comparación de una media experimental con un dato conocido

Este tipo de análisis estadístico es utilizado a menudo para determinar la exactitud de un resultado. Realizar una prueba t permite concluir si la media experimental ( $\bar{x}$ ) es significativamente diferente del dato conocido ( $\mu$ ), calcular el porcentaje de error relativo (%Error) indica cuan desviada está dicha media del valor real.

El error relativo es definido de acuerdo a la ecuación 4 y no representa un contraste de significancia como la prueba t.

$$\%Error = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\mu} * 100 \quad (Ec.4)$$

La prueba de significancia mediante la aplicación del estadístico t *student*, plantea la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que el método analítico no está sujeto a errores sistemáticos. Suponiendo que la hipótesis nula es verdadera, la teoría estadística se puede aplicar para calcular la probabilidad de que la diferencia observada (o superior a ella) entre  $\bar{x}$  y  $\mu$  se debe solamente a errores aleatorios. Cuanto más pequeña sea la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar, menos probable será que la hipótesis nula sea verdadera. Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia ocurra por azar, es menor a 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%).

Para decidir si la diferencia entre  $\bar{x}$  y  $\mu$  es significativa, es decir para contrastar  $H_0$ : la media de la población es igual al valor conocido, se calcula el estadístico t de acuerdo a la ecuación 5;

$H_0$  se rechaza cuando el valor  $t$  calculado es menor al  $t$  tabulado, algunos software más sofisticados comparan estos dos valores del estadístico  $t$  para arrojar la probabilidad de que la hipótesis nula no sea falsa.

$$t = |\bar{x} - \mu| * \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (Ec. 5)$$

Donde:

$s$ : Corresponde a la desviación estándar de los datos experimentales y está dado por la ecuación 6.

$n$ : Representa el tamaño muestral

$x_i$ : cada uno de los datos experimentales..

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (Ec. 6)$$

### 2.7.2 Comparación de dos medias experimentales

Cuando se quieren comparar dos series de datos experimentales, puede recurrirse a calcular la desviación estándar entre las dos medias, la varianza de las mismas (dada por la 2 potencia de la desviación estándar), el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (dada por 100 veces la desviación estándar dividida entre el promedio de las medias) o de manera más concreta, utilizando una nueva versión del estadístico  $t$  *student*; a excepción de la  $t$  *student*, los demás cálculos pueden aplicarse para comparar más de dos series de datos.

Para la prueba  $t$  utilizada en este caso se tienen dos medias muestrales  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$  y se plantea la  $H_0$  de que los dos métodos utilizados plantean el mismo resultado (asumiendo que cada resultado fue obtenido con un método diferente). 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 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  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ , se calcula el estadístico  $t$  con  $n_1 + n_2$  grados de libertad, de acuerdo a la ecuación 7, donde  $s$  se calcula a partir de la ecuación 8 suponiendo que las muestras se extraen de poblaciones con desviaciones estándar iguales.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (Ec. 7)$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (Ec. 8)$$

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. Para contratar  $H_0$  en estas circunstancias se utilizan las ecuaciones 9 y 10 para el estadístico  $t$  y los grados de libertad respectivamente.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1}{n_1} + \frac{s_2}{n_2}}} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\text{Grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)} \quad (\text{Ec. 10})$$

El análisis estadístico para comparar dos medias muestrales, no necesariamente requiere que los datos sean extraídos de dos tipos de métodos diferentes, también puede aplicarse cuando se realiza algún cambio en el método utilizado y se desea corroborar si existe diferencia entre los datos obtenidos mediante el método original y los obtenidos con el cambio realizado.

### 2.7.3 Comparación de dos o más medias experimentales mediante ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación de dos o más medias muestrales, contrastando si sus diferencias son demasiado grandes para atribuirse a errores aleatorios.

Considérense  $h$  muestras, cada una con  $n$  elementos donde  $x_{ij}$  es la  $j$ -ésima medida de la  $i$ -ésima muestra. Las medias de la muestra son  $\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_h$  y la media de todos los valores agrupados juntos es  $\bar{x}$ . La hipótesis nula adoptada es que todas las muestras se extraen de una población con media  $\mu$  y varianza  $\sigma_0^2$ . Bajo esta hipótesis,  $\sigma_0^2$  se puede estimar de dos formas, una estudia la varianza dentro de las muestras y la otra entre las muestras.

#### 1. Variación dentro de muestras

Para cada muestra se puede calcular la varianza utilizando la ecuación 11.

$$\sigma^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (\text{Ec. 11})$$

La fórmula general para la estimación de  $\sigma_0^2$  dentro de muestras se presenta en la ecuación 12.

$$\sigma_0^2 = \frac{\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{h(n - 1)} \quad (\text{Ec. 12})$$

El sumatorio sobre  $j$  y la división por  $(n-1)$  proporciona varianza de cada muestra; el sumatorio sobre  $i$  y la división por  $h$  promedian estas varianzas muestrales. La expresión de la ecuación 12 se denomina media cuadrática puesto que conlleva una suma de términos cuadráticos dividida por los grados de libertad.

#### 2. Variación entre muestras

Si todas las muestras se extraen de una población cuya varianza es  $\sigma_0^2$ , entonces sus medias proceden de una población con varianza  $\sigma_0^2/n$ . Así pues, si la hipótesis nula es verdadera, la varianza de las medias de las muestras proporciona una estimación de  $\sigma_0^2/n$ , sin embargo si la media de una muestra cambiara, entonces la estimación de  $\sigma_0^2$  también cambiaría. En general la variación entre muestras está dada por la ecuación 13.

$$\sigma_0^2 = \frac{\sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(h-1)} \quad (\text{Ec. 13})$$

Que al ser una media cuadrática supone dividir una suma de términos cuadráticos entre los grados de libertad.

Si la hipótesis nula es correcta, estas dos estimaciones de  $\sigma_0^2$  no deberían diferir significativamente. Si es incorrecta, la estimación entre muestras de  $\sigma_0^2$  será mayor que la estimación dentro de las muestras debido a la variación entre muestras. Para contrastar si la estimación entre muestras es significativamente más grande se utiliza un contraste F de una cola. El contraste F es un contraste de significación que utiliza el estadístico F tabulado para determinar si hay diferencias significativas entre dos varianzas  $s_1^2$  y  $s_2^2$  con grados de libertad 1 y 2 respectivamente, se define por la razón entre las dos varianzas ( $s_1^2/s_2^2$ ) donde 1 y 2 se disponen de modo que F sea siempre mayor o igual a 1; el número de grados de libertad del numerador y denominador son  $n_1-1$  y  $n_2-1$  respectivamente.

Cuando el estadístico F calculado de la razón  $\sigma_0^2$  entre grupos y  $\sigma_0^2$  dentro de grupos es menor que el F tabulado para sus respectivos grados de libertad, se acepta la hipótesis nula y se concluye que las medias muestrales no difieren significativamente entre sí, o expresado de otra forma, el valor-p es mayor 0,05. El valor-p se define como la probabilidad correspondiente al estadístico de ser posible bajo la hipótesis nula. Si el valor-p cumple con la condición de ser menor al nivel de significancia impuesto arbitrariamente (normalmente 0,05), entonces la hipótesis nula será, eventualmente, rechazada.

#### 2.7.4 Distribución normal de las poblaciones (prueba de Shapiro-Wilk)

Muchos contrastes estadísticos suponen que los datos utilizados provienen de una población normal, para verificarlo se suele utilizar el contraste chi-cuadrado, sin embargo este último es aplicable cuando se cuenta con un conjunto mayor a 50 datos, que normalmente no es así. La alternativa al contraste de chi-cuadrado cuando se tiene un conjunto menor a 50 datos es la prueba de Shapiro-Wilk (Gutiérrez y de la Vara, 2012).

Considérese una muestra aleatoria de datos  $x_1, x_2, \dots, x_n$  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:

$H_0$ : Los datos proceden de una distribución normal ( $F(x)$  es normal).

$H_A$ : Los datos no proceden de una distribución normal ( $F(x)$  no es normal).

Los pasos para la prueba de Shapiro-Wilk son: 1) Se ordenan los datos de menor a mayor. Denótese los datos ordenados por  $x_{(1)}, x_{(2)}, \dots, x_{(n)}$ . 2) De tablas dadas para este procedimiento se obtienen los coeficientes  $a_1, a_2, \dots, a_k$ , donde  $k$  es aproximadamente  $n/2$ . 3) Se calcula el estadístico  $W$  definido de acuerdo a la ecuación 14:

$$W = \frac{1}{(n-1)s^2} \left[ \sum_{i=1}^k a_i (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) \right]^2 \quad (\text{Ec. 14})$$

De la misma forma que con otros estadísticos, si el  $W$  calculado es menor al tabulado, se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos proceden de una distribución normal.

### 2.7.5 Prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene)

Esta prueba se utiliza para probar la hipótesis acerca de la igualdad de varianzas de una variable. La hipótesis nula para la prueba de homogeneidad de varianzas es que la variable exhibe igual varianza dada frente a la alternativa de que la variable no exhibe igual varianza. Para su cálculo se siguen los pasos:

1. Calcular la diferencia (en valor absoluto) entre cada valor y la media de su grupo:

$$D_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_j| \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde  $X_{ij}$  es la puntuación del sujeto  $i$  perteneciente al grupo  $j$  y  $\bar{X}_j$  es la media del grupo  $j$ .

2. Calcular la media de las diferencias de cada grupo:

$$\bar{D}_j = \frac{\sum D_{ij}}{n_j} \quad (\text{Ec. 16})$$

Donde el numerador corresponde a la sumatoria de las puntuaciones  $D$  en el grupo  $j$  y el denominador corresponde al tamaño del grupo  $j$ .

3. Calcular la media total de las diferencias:

$$\bar{D}_t = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k D_{ij}}{N} \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde el numerador corresponde a la sumatoria de las puntuaciones  $D$  de todos los sujetos y el denominador a la suma de dichos sujetos.

4. Calcular la suma de cuadrados intragrupos:

$$SC_{intra} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k (D_{ij} - \bar{D}_j)^2 \quad (\text{Ec. 18})$$

5. Calcular la suma de cuadrados intergrupos:

$$SC_{inter} = \sum_{j=1}^k n_j (\bar{D}_j - \bar{D}_t)^2 \quad (\text{Ec. 19})$$

6. Calcular los grados de libertad:

$$G.L. \text{ inter} = k - 1; \text{ siendo } k \text{ el número de grupos} \quad (\text{Ec. 20})$$

$$G.L. \text{ (intra)} = \sum_{j=1}^k (n_j - 1); \text{ siendo } n_j \text{ el tamaño muestral del grupo } j. \quad (\text{Ec. 21})$$

7. Calcular la media cuadrática intergrupos usando los resultados de los pasos 5 y 6.
8. Calcular la media cuadrática intragrupos usando los resultados de los pasos 4 y 6.
9. Calcular el estadístico  $F$  dividiendo los resultados de los pasos 7 y 8 y compararlo frente al valor  $F$  tabulado para determinar si hay o no diferencia significativa.

Si el valor  $F$  que se encuentra es menor que el valor  $F$  tabulado, se acepta la hipótesis nula de que las varianzas exhiben comportamiento homogéneo.

La importancia de implementar las herramientas estadísticas como fuentes que evidencien la confiabilidad de los resultados, es objetiva para laboratorios que buscan la acreditación frente a entes regulatorios nacionales o internacionales tales como la Organización Internacional de Estandarización (ISO, por sus siglas en inglés) y el ICONTEC. Para los laboratorios responsables de industrias de alimentos y/o de otros productos destinados al consumo humano, acreditarse garantiza la calidad e inocuidad de dichos productos, protegiendo siempre la salud y las expectativas del cliente, además de demostrar de esta forma que son técnicamente competentes y que sus resultados son veraces y válidos. Son las herramientas estadísticas las que evalúan la metodología analítica establecida para realizar un análisis fisicoquímico determinado, de manera que los resultados obtenidos sean puntuales y concisos en el transcurso de su ejecución. Conocer el contenido de metanol y congéneres en la materia prima y el producto terminado de la ILC es lo que garantiza que se mantengan bajo el margen de la reglamentación establecida por el ICONTEC y que sus productos cumplen con los parámetros de calidad vigentes.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Implementar y validar una metodología para determinar y cuantificar metanol y congéneres regulados por el ICONTEC en muestras de alcohol etílico extraneutro utilizado para la fabricación de bebidas alcohólicas en la Industria Licorera del Cauca, empleando la cromatografía de gases como técnica de análisis.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Optimizar la separación de metanol y congéneres en función de la resolución de los picos y el tiempo de análisis, variando las condiciones cromatográficas para su posterior cuantificación por el método de patrón interno.
- Estandarizar y validar la metodología GC/FID para la cuantificación de metanol y congéneres en alcohol etílico en el equipo AGILENT GC7890B.
- Aplicar el método estandarizado en el análisis de muestras reales de la Industria Licorera del Cauca.

## 4. Metodología

### 4.1 Materiales, equipos y reactivos

Las tablas 5, 6 y 7 muestran el listado de los materiales, equipos y reactivos utilizados con algunas de sus especificaciones.

**Tabla 5.** Material utilizado en los procedimientos

Material	Denominación (mL)	Cantidad	Límite de error	Marca
Balón aforado	10	10	±0,04 mL	BLAUBRAND
	50	5	±0,06 mL	
	100	3	±0,1 mL	
	10	10	±0,025 mL	SCHOTT
	25	5	±0,04 mL	
	250	1	±0,15 mL	
	1000	1	±0,4 mL	
Vaso de precipitado	50	5		
	100	3		
Frasco de vidrio	100	2	N.A.	
	25	15		
Jeringas desechables para insulina	1	13		Becton Dickinson

N.A.: No aplica por no ser material volumétrico

**Tabla 6.** Equipos utilizados en los procedimientos

Equipos y accesorios	Especificaciones
Micropipeta 20-200 µL	Transferpette BRAND
Micropipeta 100-1000 µL	
Termómetro digital	Control company
Balanza analítica	OHAUS
Cromatógrafo de gases	AGILENT 7890B
Autoinyector de muestras líquidas (ALS)	AGILENT G4513A
Muestreador Headspace (HS)	AGILENT 7697A
Viales para ALS 400 µL	AGILENT
Viales para HS 20 mL	

El material de vidrio se limpió con agua, jabón y ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 5% como solución limpiadora, los frascos de vidrio además fueron sometidos a ultrasonido con solución limpiadora y los balones y vasos de precipitado siempre fueron purgados con etanol extraneuro rectificado antes de ser utilizados. El material volumétrico fue calibrado de acuerdo al numeral 4.2 y los equipos y accesorios de la tabla 6 fueron calibrados por técnicos encargados de las casas comerciales Khymo's y ONAC y el laboratorio de metrología de la Universidad del Valle; los certificados de calibración se muestran en el Anexo 1 (1.1-1.5).

**Tabla 7.** Reactivos utilizados en los procedimientos

Reactivos*	Pureza	Marca	Punto de ebullición
Acetaldehído	0,990	AppliChem PanReac	20,2 °C
Metanol	0,998		64,7 °C
iso-propanol	0,999		82,6 °C
MetilAcetato	0,995		57,1 °C
n-propanol	0,990		97,0 °C
EtilAcetato	0,999		77,1 °C
sec-butanol	0,990	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99,0 °C
iso-butanol	0,998		108,0 °C
n-butanol	0,999		117,7 °C
3-metilbutanol	0,996		130,0 °C
2-metilbutanol	0,995		128,0 °C
Furfural	0,997		161,7 °C
3-pentanol	0,995		116,2 °C
Etanol	0,960	SODERAL	78,4 °C
Agua	Desionizada	N.A.	100,0 °C

\*Los nombres de los reactivos corresponden a sus nombres comerciales y no los IUPAC  
N.A. No aplica

#### 4.2 Calibración de material volumétrico

Se llevó a cabo la calibración de más de 50 balones aforados de diferentes denominaciones, seleccionando 35 de ellos que cumplieron a cabalidad con el protocolo de calibración descrito por la casa comercial que fabrica la instrumentación (BLAUBRAND, 2015).

Los balones aforados fueron clasificados como aparatos volumétricos ajustados por contenido 'In', elaborados de vidrio borosilicato 3.3 (Boro 3.3), sus límites de error admisible pueden ser revisados en la tabla 5. Según el protocolo BLAUBRAND para la calibración de material de vidrio, este tipo de materiales pueden ser verificados con un solo control, sin embargo, para obtener más confiabilidad, se recomienda utilizar el valor medio que resulta de 3 valores medidos. Al hacerlo, la dispersión de los valores individuales no debe ser mayor que un tercio del límite de error admisible del aparato de medida.

El control gravimétrico de aparatos volumétricos está descrito en la norma DIN EN ISO 4787 donde también está indicada la fórmula general de cálculo que se muestra en la ecuación 27:

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \left( \frac{1}{\rho_w - \rho_L} \right) \left( 1 - \frac{\rho_L}{\rho_G} \right) (1 - \gamma(t - 20^\circ C)) \quad (Ec. 27)$$

Tomando en cuenta la aplicación muy complicada de esta fórmula y el gran número de tablas necesarias, el cálculo ha sido simplificado para la introducción de un factor "Z" que se muestra en la ecuación 28, que considera el peso de ajuste de la balanza ( $\rho_G$ ), la densidad atmosférica en función de la presión del aire, de la temperatura y de la humedad relativa del aire del 40-90% ( $\rho_L$ ), la densidad del agua en función de la temperatura ( $\rho_w$ ) y el coeficiente de expansión del aparato volumétrico ( $\gamma$ ). El valor Z es un coeficiente tabulado que se encuentra en el protocolo.

$$V_{20} = Z(W_2 - W_1) \quad (\text{Ec. 28})$$

Donde:

- $V_{20}$  [mL]: volumen del aparato de medida a 20 °C.
- $W_2 - W_1$ : Valor obtenido de la pesada del aparato de medida lleno menos el valor obtenido de la pesada del aparato de medida vacío.
- $Z$  [mL/g]: Factor de los parámetros de control resumidos.

Los valores de  $Z$  para temperaturas entre 20 °C y 29°C pueden ser interpolados linealmente mediante una recta de ecuación 29:

$$y = 0,0003x + 0,9973 \quad (\text{Ec. 29})$$

Donde “y” representa al factor  $Z$  y “x” es el valor de temperatura en este rango.

### 4.3 Preparación de soluciones estándar

Se prepararon soluciones madre de metanol y cada uno de los congéneres pesando los valores que se muestran en la tabla 8 y aforando a 10 mL con etanol extraneuro rectificado obteniendo soluciones de concentración  $C_1$ . Alícuotas de volumen  $V_1$  de cada una de las 12 soluciones preparadas fueron extraídas y aforadas a una misma solución de 100 mL para obtener una concentración final de 100 mg/L para cada congénere, con esta solución se trabajó inicialmente.

**Tabla 8.** Preparación de la solución de trabajo inicial

Analito	Pureza (%)	CAS	m (mg)	$C_1$ (mg/L)	$V_1$ ( $\mu$ L)
Acetaldehído	0,990	75-07-0	107,0	10593,0	944
Metanol	0,998	67-56-1	104,9	10469,0	955
i-propanol	0,999	79-20-9	109,2	10909,1	917
MetilAcetato	0,995	547-63-7	102,8	10228,6	978
n-propanol	0,990	71-23-8	104,4	10335,6	968
EtilAcetato	0,999	141-78-6	107,1	10699,3	935
s-butanol	0,990	78-92-2	108,3	10721,7	933
i-butanol	0,998	71-36-3	109,4	10918,1	916
n-butanol	0,999	78-92-2	107,1	10699,3	935
3-metilbutanol	0,996	110-93-1	106,3	10587,5	945
2-metilbutanol	0,995	66-25-1	106,4	10586,8	945
Furfural	0,997	98-01-1	105,1	10478,5	954

### 4.4 Evaluación de las condiciones cromatográficas

Fue necesario examinar las condiciones de trabajo empleadas en la cromatografía de gases con el objetivo de obtener un método que se ajustara a las exigencias industriales que abarcan características como rapidez, economía y obtención de resultados analíticamente aceptables. Las condiciones evaluadas fueron el tipo de columna y el modo de inyección; haciendo uso del

software Statgraphics Centurión versión 16.1.03 se evaluó la rampa de temperatura del horno y flujo de gas portador, y por último la temperatura de inyección y de detección, fueron establecidas de acuerdo a las propiedades físicas de los analitos más termolábiles.

Se utilizó una solución multicomponente de 100 mg/L de metanol y cada uno de los congéneres, para evaluar las condiciones cromatográficas.

#### 4.4.1 Condiciones iniciales del método cromatográfico

La temperatura de inyección se estableció en 160 °C, teniendo en cuenta que es una temperatura cercana al punto de ebullición más alto entre el grupo de congéneres (furfural: 161,7°C). La temperatura del detector se estableció en 230°C con un flujo de aire de 400 mL/min, un flujo de hidrógeno de 30 mL/min y un flujo makeup de 20 mL/min; inicialmente se estableció el modo de inyección *split* 7:1 (Hernández, Recalde y Erazo, 2015).

#### 4.4.2 Tipo de columna

Teniendo en cuenta el grupo de compuestos a analizar, se evaluaron 4 alternativas de columna, cuyas características se muestran en la tabla 9. Se estableció una programación similar en el horno de la columna para los ensayos de: 40°C durante 5 minutos, subiendo a una rampa de 10°C/min hasta 150°C, donde permanece nuevamente isotérmica durante 5 minutos. Para la segunda y tercer columna de la tabla 9, la temperatura inicial no fue 40 sino 30°C ya que su rango térmico es mayor; para la última columna de la tabla 9, la temperatura inicial se estableció en 35°C. Se escogió la columna que mostró mejores resultados cromatográficos.

**Tabla 9.** Características de las columnas evaluadas

Columna	Longitud (m)	i.d. (mm)	Grosor (µm)	Fase estacionaria	Rango térmico	Aplicación
HP-5	30	0,32	0,25	5% fenil-metilpolisiloxano 95% dimetilpolisiloxano	-60-325 °C	Ésteres
HP-INNOW <sub>ax</sub>	30	0,25	0,25	100 % polietilenglicol	40-260 °C	Alcoholes
AT <sup>TM</sup> - AQUAWAX	60	0,25	0,25	100% polietilenglicol modificado con ácido nitrotrefáltico	40-250 °C	Alcoholes
DB-624 UI	30	0,25	1,40	6% ciano-propil fenilo 94% dimetilpolisiloxano	-20-260 °C	Volátiles

i.d. diámetro interno

#### 4.4.3 Técnica de inyección

Se evaluó el modo de inyección *splitless*, y *split* en las relaciones 10:1, 25:1, 50:1 y 100:1 de acuerdo a Feng *et al.* (2015), también se examinaron relaciones *split* 7:1 y 5:1. El modo de inyección por espacio de cabeza, conocido por sus siglas en inglés HS (HeadSpace) también fue evaluado de forma *splitless* y *split* en relaciones 7:1 y 10:1. Las condiciones para realizar la inyección por headspace fueron: a) temperatura del horno: 130 °C, b) temperatura del loop: 140°C y c) temperatura de la línea de transferencia: 160°C, d) tiempo de equilibrio del vial: 10 minutos, e) tiempo de presurización: 0,2 minutos, f) tiempo de equilibrio del loop: 0,2 minutos, g) presión del vial: 13 psi.

#### 4.4.4 Efecto del solvente

Se evaluaron las soluciones etanólicas: 20, 25, 30, 35, 40 y 96,10% v/v que corresponde al etanol extraneutro rectificado utilizado hasta este punto. Se escogió para futuros ensayos, el que menor “frente de solvente” presentó, es decir el que menos efecto causaba sobre los cromatogramas. La solución de trabajo para los siguientes experimentos, constó de una solución de 100 mg/L preparada como muestra la tabla 8, pero aforada con el solvente escogido en este numeral.

#### 4.4.5 Diseño experimental para la temperatura de análisis y flujo de gas portador

Las variables independientes que se trabajaron en el diseño experimental, fueron el flujo de gas portador y la rampa de temperatura en el horno. Las variables de respuesta analizadas fueron el tiempo de análisis (medido en función del tiempo de elución del último analito) y la resolución total de los picos cromatográficos. La temperatura en el horno se programó a 35°C durante 5 minutos, subiendo hasta 110°C a una rampa  $X$  °C/min, donde permaneció constante 5 minutos más. El valor  $X$  de rampa puede ser apreciado como una de las dos variables independientes estudiadas en este diseño. La optimización se llevó a cabo por el método de superficie de respuesta (RSM), usando un diseño factorial central compuesto  $2^2$  + puntos estrella, generado por el software Statgraphics Centurión, versión 16.1.03. Las tablas 10, 11 y 12 muestran las condiciones del diseño y la distribución de las condiciones experimentales.

**Tabla 10.** Factores y niveles del diseño experimental

Factor	Unidades	Bajo	Alto
Flujo	mL/min	1,00	1,30
Rampa	°C/min	4,00	10,00

**Tabla 11.** Resumen del diseño experimental

Componente del Diseño	Unidades Experimentales
Factorial $2^2$	4
Puntos estrella	4
Réplicas en el punto central	3

**Tabla 12.** Matriz del Diseño experimental

	Flujo (mL/min)	Rampa (°C)	# Experimento
Factorial	1,00	4,00	2
	1,30	10,00	11
	1,00	10,00	8
	1,30	4,00	10
Puntos estrella	0,94	7,00	1
	1,15	11,24	3
	1,15	2,76	4
	1,36	7,00	7
Punto central	1,15	7,00	5,6 y 9

Las condiciones experimentales óptimas fueron establecidas por el software statgraphics y posteriormente empleadas para la determinación de los analitos de interés.

#### 4.5 Elección del patrón interno

El principal criterio para la elección del patrón interno a emplear en la metodología de cuantificación, es el punto de ebullición y las propiedades fisicoquímicas del mismo (estructura orgánica, solubilidad, presión de vapor). La tabla 13 muestra las propiedades de los candidatos a patrón interno ensayados. Cabe resaltar que el punto de ebullición del metanol y el grupo de congéneres estudiados, varía entre 20,2 y 161,7°C.

**Tabla 13.** Propiedades de los posibles patrones internos ensayados

#	Patrón interno	Punto Ebullición (°C)	Estructura
1	2-metil-4-pentanol	131,6	Alcohol
2	n-pentanol	138,0	
3	2-pentanol	119,3	
4	3-pentanol	116,2	
5	Hexanal	130,0	Aldehído
6	Pentanal	103,0	
7	Isubutiraldehído	63,0	
8	Formiato de etilo	54,3	Éster
9	Isobutirato de metilo	102,0	
10	Acetona	56,0	Cetona

Se prepararon soluciones de 100 mg/L de cada compuesto y se analizaron en el sistema cromatográfico, escogiendo como patrón interno para futuros análisis, aquél cuyo tiempo de retención no presentó efectos de solapamiento sobre los picos cromatográficos analizados.

#### 4.6 Determinación de los parámetros de validación

##### 4.6.1 Límites de detección y cuantificación

Se evaluaron concentraciones progresivamente menores del metanol y congéneres, a partir de una solución multicomponente de 10 mg/L, midiendo en cada caso el valor de la relación señal ruido (S/N) mediante el uso del software OpenLAB-Chemstation Edition-AGILENT 7890B que controla el cromatógrafo de gases. Las concentraciones evaluadas fueron 10,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 y 0,5 mg/L. Se adicionó en cada una de las soluciones una cantidad de patrón interno tal, que las soluciones finales contenían 5 mg/L de dicho patrón interno. El valor de la relación S/N=3 fue establecido como parámetro para determinar el LD y el valor S/N=10 fue establecido como parámetro para determinar el LC, por tanto las concentraciones evaluadas que igualaban o excedían estos valores de S/N, fueron determinadas como concentraciones iguales o mayores al LD o LC. Además, se evaluó el CV obtenido en los triplicados de cada punto.

##### 4.6.2 Linealidad y rango dinámico

Con el fin de evaluar la linealidad del método para la cuantificación de metanol y congéneres, se prepararon un conjunto de soluciones de concentraciones progresivamente mayores, a partir de una solución multicomponente de referencia (las concentraciones de cada componente se presentan en la tabla 14). a) Se calculó un primer coeficiente de determinación lineal ( $R^2$ ) entre

los 7 niveles utilizados para elaborar la curva de calibración (estos 7 niveles corresponden a volúmenes de 20, 40, 80, 150, 250, 350 y 500  $\mu\text{L}$  de la solución simplificada en la tabla 14, cada uno de estos volúmenes, aforados a 10 mL). b) Se calculó un segundo  $R^2$  entre 8 niveles de concentración, añadiendo a la “curva a)” un nivel de 2000  $\mu\text{L}$  de la solución mostrada en la tabla 14, también aforado a 10 mL. c) Se calculó un tercer  $R^2$  entre 9 niveles de concentración, añadiendo a la “curva b)” un nivel de la solución mostrada en la tabla 14 sin diluir. Los tres  $R^2$  obtenidos para cada uno de los analitos, se evaluaron para determinar si en alguna de las curvas (a, b o c) disminuía apreciablemente, indicando una pérdida de la linealidad del sistema. Cada nivel contenía 25 mg/L de PI.

**Tabla 14.** Solución de trabajo para determinar la linealidad

Grupo de analito	Analito	Concentración (mg/L)
Aldehídos	Acetaldehído	
	i-propanol	
	n-propanol	
Alcoholes superiores	s-butanol	1000
	i-butanol	
	3-metilbutanol	
	2-metilbutanol	
Alcoholes superiores	n-butanol	1500
Ésteres	EtilAcetato	
	MetilAcetato	2000
Furfural	Furfural	
Metanol	Metanol	5000

La solución de la tabla 14 se convirtió en la solución de madre para elaborar las curvas de calibración posteriores.

Se consideró que un coeficiente de determinación mayor a 0,998 se ajustaba adecuadamente a una relación lineal entre la concentración y el área obtenida para cada uno de los analitos.

#### 4.6.3 Precisión

Con la solución madre elaborada en la tabla 14 se prepararon curvas de calibración de 7 niveles además de una solución blanco, las concentraciones de cada nivel se presentan en la tabla 15 y corresponden a la adición de 0, 20, 40, 80, 150, 250, 350 y 500  $\mu\text{L}$  de la solución madre, cada nivel con un contenido de 250  $\mu\text{L}$  de patrón interno 1000 mg/L y aforado a 10 mL respectivamente.

La tabla 16 muestra las relaciones de concentración entre analito y patrón interno ( $C_A/C_{PI}$ ) preparadas, teniendo en cuenta que cada nivel de concentración de la curva de calibración (tabla 15) contenía también 25 mg/L de patrón interno (PI), es decir, la tabla 16 muestra cada una de las concentraciones de la tabla 15, dividida entre 25 mg/L (correspondiente a la concentración de PI).

Los niveles de precisión determinados fueron clasificados en precisión intermedia, repetibilidad y reproducibilidad, evaluando cada parámetro mediante la estadística correspondiente, haciendo uso del software IBM SPSS Statistics, versión 23. Cabe resaltar que en adelante, en

cada análisis, una curva de calibración se refiere en realidad a una curva de calibración por cada uno de los analitos (el metanol y los 11 congéneres), es decir que son 12 curvas de calibración diferentes.

**Tabla 15.** Concentración en mg/L, obtenida para cada uno de los niveles de la curva de calibración, elaborados a partir de la tabla 14

Grupo de analito	C <sub>1</sub> (mg/L)	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6	Nivel 7
		20 µL	40 µL	80 µL	150 µL	250 µL	350 µL	500 µL
Aldehídos								
Alcoholes superiores	1000,0	2,0	4,0	8,0	15,0	25,0	35,0	50,0
n-butanol	1500,0	3,0	6,0	12,0	22,5	37,5	52,5	75,0
Ésteres								
Furfural	2000,0	4,0	8,0	16,0	30,0	50,0	70,0	100,0
Metanol	5000,0	10,0	20,0	40,0	75,0	125,0	175,0	250,0

**Tabla 16.** Relaciones de concentración (C<sub>A</sub>/C<sub>PI</sub>) obtenidas para los niveles de la curva de calibración

Grupo de analito	C <sub>1</sub> (mg/L)	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6	Nivel 7
		20 µL	40 µL	80 µL	150 µL	250 µL	350 µL	500 µL
Aldehídos								
Alcoholes superiores	1000,00	0,08	0,16	0,32	0,60	1,00	1,40	2,00
n-butanol	1500,00	0,12	0,24	0,48	0,90	1,50	2,10	3,00
Ésteres								
Furfural	2000,00	0,16	0,32	0,64	1,20	2,00	2,80	4,00
Metanol	5000,00	0,40	0,80	1,6	3,00	5,00	7,00	10,00

### 1. Repetibilidad

Se analizaron tres curvas de calibración por patrón interno, cada una con 7 puntos (cada punto por triplicado) como se muestra en la tabla 16. Se determinó el coeficiente de variación entre los tres valores de la pendiente obtenida por el software OpenLAB-Chemstation Edition-AGILENT 7890B, resultado obtenido de graficar el promedio del triplicado de la relación de áreas obtenidas para cada nivel contra la relación de sus respectivas concentraciones, se ignoró el CV del intercepto debido a su proximidad a 0. Se realizó un análisis de varianza entre la relación de áreas obtenidas para cada nivel, evaluando si difieren significativamente dependiendo del momento del análisis.

### 2. Precisión intermedia

Se analizó una curva de calibración por patrón interno, con un total de 7 puntos (cada punto por triplicado) durante 5 días consecutivos. Se determinó el coeficiente de variación entre los cinco valores de la pendiente obtenida por el software OpenLAB-Chemstation Edition-AGILENT 7890B, resultado obtenido de graficar el promedio del triplicado de la relación de áreas obtenidas para cada nivel (en cada uno de los días) contra la relación sus respectivas concentraciones, se ignoró el CV del intercepto debido a su proximidad a 0. Se realizó un

análisis de varianza entre la relación de áreas obtenidas para cada nivel, evaluando si difieren significativamente dependiendo del día.

### 3. Reproducibilidad

Se analizaron tres curvas de calibración por patrón interno, cada una con 7 puntos (cada punto por triplicado) durante los días 1, 4, 8, 15 y 30. Se determinó el coeficiente de variación entre los quince valores de la pendiente obtenida por el software OpenLAB-Chemstation Edition-AGILENT 7890B, resultado obtenido de graficar el promedio del triplicado de la relación de áreas obtenidas para cada nivel contra la relación sus respectivas concentraciones, se ignoró el CV del intercepto debido a su proximidad a 0. Se realizó un análisis de varianza entre las pendientes obtenidas durante cada uno de los días, evaluando si difieren significativamente en intervalos largos de tiempo.

#### 4.6.4 Exactitud

Para estimar la exactitud del método de cuantificación, se evaluaron tres niveles de concentración a valores bajos, medios y altos de metanol y cada uno de los congéneres, además se analizó la exactitud del método en el proceso de dilución respecto a una “solución muestra” cuya concentración se hallaba por fuera del rango de trabajo. La tabla 17 muestra las concentraciones evaluadas teniendo en cuenta que cada solución contiene 25 mg/L de patrón interno.

**Tabla 17.** Concentraciones utilizadas para evaluar la exactitud

Grupo de analito	C <sub>1</sub> (mg/L)	Nivel				
		Bajo 25 µL	Medio 200 µL	Alto 450 µL	Muy alto 2000 µL	Muy alto diluído 2000 µL 1:10
Aldehídos	1000	2,5	20	45	200	20
Alcoholes superiores						
n-butanol	1500	3,75	30	67,5	300	30
Ésteres	2000	5	40	90	400	40
Furfural						
Metanol	5000	12,5	100	225	1000	100

En total, 5 soluciones fueron utilizadas para evaluar la exactitud mediante el porcentaje de error relativo (%Error).

#### 4.6.5 Robustez

La robustez del método de cuantificación se verificó mediante el análisis de soluciones patrón por analistas diferentes empleando el método completamente optimizado. Se realizó una prueba t para dos medias experimentales usando el software IBM SPSS Statistics, versión 23, comparando las relaciones de área obtenidas para cada solución patrón y analito, además se determinó si existía diferencia significativa en los resultados obtenidos al cambiar de analista. Los CV de las relaciones de área para cada nivel y analito fueron obtenidos durante los análisis.

#### **4.7 Estabilidad térmica de las soluciones patrón**

Para evaluar la estabilidad en el vial de inyección cromatográfico, se utilizó el nivel 5 de la curva de calibración (centro de gravedad de dicha curva). La solución del vial fue inyectada por duplicado y luego nuevamente la solución del mismo vial fue inyectada por duplicado a las 6 horas de la primera aplicación, un segundo ensayo en un nuevo vial se realizó ampliando el plazo de aplicación a 12 horas. En cada caso para determinar si la estabilidad de la solución se deterioraba en las condiciones indicadas, se aplicó una prueba t para comparar la relación de áreas obtenidas a diferentes tiempos de análisis.

#### **4.8 Examen de aptitud del método**

Los exámenes de aptitud son una herramienta de aseguramiento de la calidad que permite a los laboratorios comparar su desempeño con otros, detectar tendencias y, por lo tanto, tomar cualquier acción preventiva o correctiva que sea necesaria para asegurar su competencia técnica y mejora continua, tiene como finalidad utilizar los resultados de desempeño obtenidos por los laboratorios, para evaluar la competencia técnica en la aplicación de métodos de ensayo o calibración específicos, cuando existen y resultan apropiados (Organismo Nacional de Acreditación en Colombia-ONAC, 2013).

Para evaluar la aptitud del método analítico en la determinación de metanol y congéneres por cromatografía de gases, se trabajó en colaboración con el laboratorio de control de calidad de la Industria de Licores de Caldas. La Industria de Licores del Caldas proveyó tres muestras ciegas almacenadas mediante un sistema de refrigeración para mantener las soluciones a no más de 8°C (temperatura de desempaque), el tiempo de envío y recepción a partir del día de preparación de las soluciones fue alrededor de 3 días. Las muestras adquiridas fueron inmediatamente analizadas mediante la metodología analítica planteada. Un primer análisis se realizó inyectando directamente las muestras adquiridas al sistema cromatográfico, las muestras se clasificaron como muestras de nivel de concentración bajo, medio y alto respectivamente. Con base a los resultados obtenidos, un segundo análisis se realizó diluyendo 0,250; 0,625 y 0,450 mL en 10 mL. Se encontraron 11 de los 12 analitos de interés. La Industria de Licores del Cauca, envió posteriormente al informe de los resultados por parte de la Industria Licorera del Cauca, un informe propio con las concentraciones teóricas de las muestras y un porcentaje de error aceptable para cada analito, determinado mediante análisis cromatográficos y tratamientos estadísticos propios. Los resultados fueron evaluados en función del %Error, tomando como referencia el valor teórico.

#### **4.9 Aplicación en muestras reales de la Industria Licorera del Cauca y relacionadas**

El método implementado y posteriormente validado en el laboratorio de la ILC se utilizó para analizar un conjunto de muestras de materia prima, producto terminado, producto presuntamente adulterado bajo el nombre de la ILC y producto externo a la Industria Licorera del Cauca, analizados con fines comparativos. El conjunto de muestras se presenta en la tabla 18.

Algunas de las muestras fueron diluidas debido a que su concentración excedía el rango de trabajo de la curva de calibración establecida (realizada de acuerdo a la tabla 16). Cada muestra fue aforada a 10 mL con un contenido de 25 mg/L de patrón interno.

**Tabla 18.** Conjunto de muestras reales analizadas, origen y tamaño muestral

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Origen</b>	<b>n</b>
Alcohol extraneutro rectificado	Proveedor: SODERAL	7
Alcohol extraneutro rectificado	Cubas de la ILC	6
Aguardiente Caucano Tradicional	Diferentes lotes de producción	5
Aguardiente Caucano Sin Azúcar	Diferentes lotes de producción	5
Aguardiente Caucano Tradicional	Policía Nacional: Presunta adulteración	3
Aguardiente Caucano Sin Azúcar	Policía Nacional: Presunta adulteración	3
Tafia 8 años	Barriles de la ILC	7
Ron Gorgona	Diferentes lotes de producción	7
Ron 1	Industria Licorera externa a la del Cauca	3
Ron 2	Industria Licorera externa a la del Cauca	3
Ginebra ILC	Diferentes lotes de producción	3

## 5. Análisis de resultados

### 5.1 Calibración del material de vidrio

La tabla 19 muestra los resultados de la calibración de 5 balones aforados, los resultados para cada uno de los 35 balones utilizados pueden detallarse en el Anexo 2, donde se muestra el promedio de los 5 valores de masa obtenidos, junto a su desviación estándar y el valor de la prueba 1/3 correspondiente.

**Tabla 19.** Resultados de la calibración de algunos balones aforados de acuerdo a la ecuación 27

#	Denominación	W <sub>2</sub> -W <sub>1</sub> (g)	T (°C)	Z (mL/g)	V <sub>20</sub> (mL)	s	Prueba 1/3
1	10 mL	9,9054	27,7	1,00561	9,96097	0,00953	0,01333
		9,9050	27,9	1,00567	9,96116		
		9,9155	27,5	1,00555	9,97053		
		9,9007	27,3	1,00459	9,95505		
		9,9233	27,8	1,00564	9,97927		
		9,9172	26,8	1,00534	9,97016		
2	10 mL	9,9182	26,8	1,00534	9,97116	0,00344	0,00833
		9,9237	27,1	1,00543	9,97759		
		9,9228	27,3	1,00549	9,97728		
		9,9191	27,1	1,00543	9,97296		
3	25 mL	24,8918	24,8	1,00474	25,00979	0,01235	0,01333
		24,9104	25	1,0048	25,02997		
		24,9213	24,7	1,00471	25,03868		
		24,8898	25,3	1,00489	25,01151		
		24,9013	25,7	1,00501	25,02606		
4	50 mL	49,7387	23,7	1,00441	49,95805	0,01703	0,02
		49,7371	23,4	1,00432	49,95196		
		49,756	24,2	1,00456	49,98289		
		49,7385	23,7	1,00441	49,95785		
		49,7704	23,7	1,00441	49,98989		
5	100 mL	99,2833	24,8	1,00474	99,75390	0,03123	0,03333
		99,3205	25,0	1,0048	99,79724		
		99,3025	25,2	1,00486	99,78511		
		99,3729	24,5	1,00465	99,83498		
		99,2964	24,8	1,00474	99,76706		

Puede observarse en la tabla 19, que los balones seleccionados cumplen con la prueba 1/3 BLAUBRAND para calibración de material volumétrico, siendo que la desviación estándar (s) de 5 medidas de masa de agua dentro del balón, no sobrepasa 1/3 del límite de error del material.

La calibración de los equipos usados en los procedimientos de análisis, enlistados en la tabla 6, garantizó la ausencia de error sistemático en la obtención de los resultados, debido a defectos en los instrumentos.

## 5.2 Evaluación de las condiciones cromatográficas

### 5.2.1 Condiciones generales del método cromatográfico

Estas condiciones no fueron evaluadas debido a que son fijadas de acuerdo a propiedades físico químicas de los analitos o a características de la instrumentación química utilizada, dichas condiciones fueron replicadas de reportes bibliográficos. La temperatura de inyección se estableció en 160 °C (punto de ebullición del furfural: 161,7°C), aunque normalmente se recomienda establecerla 50°C por encima del punto de ebullición del analito menos volátil (Kostik *et al.*, 2013), en este caso furfural, la baja presión de vapor característica de este compuesto (3,1 hPa) permite que se volatilice con facilidad a temperaturas cercanas a su punto de ebullición, lo cual elimina cualquier posible condensación del analito en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. La temperatura del detector se estableció en 230°C con un flujo de aire de 400 mL/min, un flujo de hidrógeno de 30 mL/min y un flujo makeup de 20 mL/min; inicialmente se estableció el modo de inyección *split* 7:1 (Hernández, Recalde y Erazo, 2015).

### 5.2.2 Tipo de columna

#### 1. HP-5 (30m X 0,32mm X 0,25µm)

Diferentes investigaciones demuestran que la fase estacionaria de la columna HP-5 (5% fenil metil polisiloxano), presenta adecuada capacidad de resolución para el análisis de ésteres; teniendo en cuenta al metilacetato y al etilacetato que conforman el grupo de congéneres, se esperaba una respuesta adecuada de esta columna. Se estableció una temperatura inicial de 30°C durante 5 minutos, aumentándola hasta 150°C a una rampa de 10°C/min, donde permaneció durante 5 minutos. La figura 2 muestra el cromatograma obtenido superpuesto a la programación de temperatura aplicada, a un flujo de 1,3 mL/min.

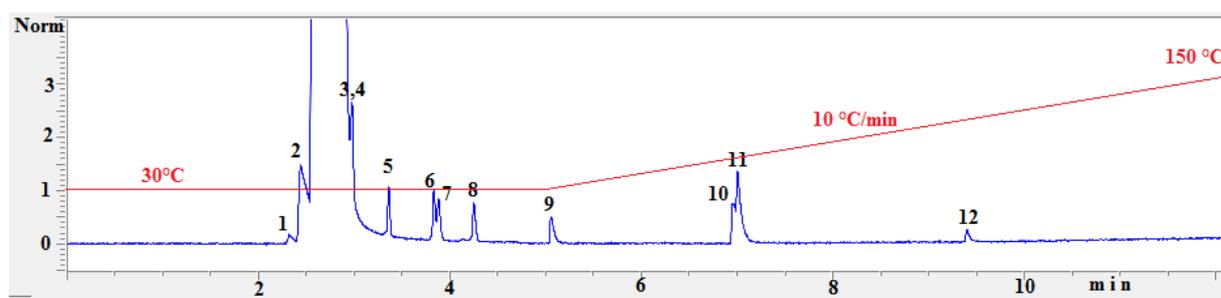


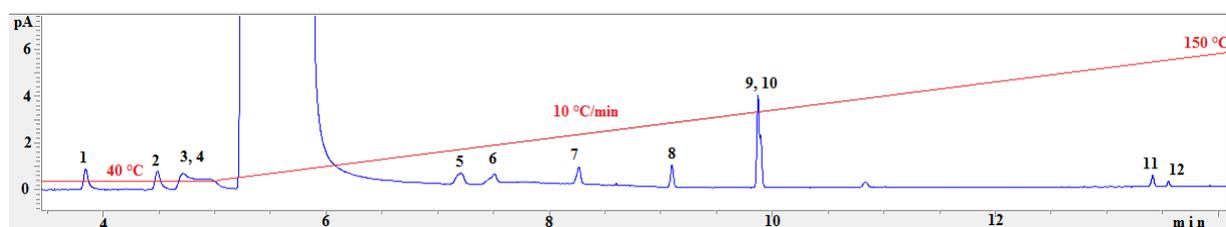
Figura 2. Cromatograma obtenido con la columna HP-5

El cromatograma obtenido muestra una pobre resolución para varios de los picos, hasta el punto donde solo pueden observarse 11 de los 12 analitos. Durante los primeros 5 minutos del análisis, han eluido 7 compuestos, lo cual indica buen potencial para manejar tiempos cortos de análisis, sin embargo los 3 primeros analitos en eluir, lo hacen junto al solvente. Durante los primeros 5 minutos la temperatura se mantiene en una isoterma de 30°C y aun así no se resuelven los tres primeros picos, lo cual indica que su resolución solo podría llevarse a cabo disminuyendo el flujo de gas portador, lo cual aumentaría el tiempo de análisis por aumento del tiempo de residencia de los analitos en la columna. Recordando que deberían observarse 12 señales, es posible que la señal que no se detecta, esté solapada con el frente de solvente, de manera que no son 3 sino 4 los picos solapados en esta zona. Nótese que hay otro par de señales que eluyen

antes del minuto 4 y sobre el minuto 7 (picos 10 y 11), las cuales presentan también pobre resolución. La inyección de estándares individuales indica que los cuatro primeros picos en eluir son el acetaldehído, metanol, isopropanol y n-propanol en ese orden dado, que corresponden a los compuestos de menor punto de ebullición si no se tienen en cuenta a los ésteres, cuya interacción con la fase estacionaria de la columna, aumenta su tiempo de retención. Aunque la columna HP-5 presenta potencial para realizar análisis rápidos, la dificultad para resolver las 4 señales que eluyen junto al solvente, sugiere probar otras posibilidades.

## 2. HP-INNOWax (30m X 0,25mm X 0,25µm)

Teniendo en cuenta que del grupo de los congéneres, el de alcoholes superiores es el predominante, se evaluó una columna con fase estacionaria polar, como lo es la HP-INNOWax cuya fase estacionaria es 100% polietilenglicol. La figura 3 muestra el cromatograma obtenido a un flujo de 1,3 mL/min de gas portador, superpuesto a la programación de temperatura establecida (igual que en la columna HP-5 con la diferencia de que la temperatura inicial se establece en 40°C).



**Figura 3.** Cromatograma obtenido con la columna HP-INNOWax

Las señales 9 y 10 muestran efectos de solapamiento, estas señales corresponden a los alcoholes amílicos (3-metilbutanol y 2-metilbutanol) que aunque se esperaban separados por una mayor interacción con la columna, se solaparon de forma no analítica. Es probable que al disminuir la rampa (a 4 °C/min por ejemplo), se mejore la resolución de estas dos señales, sin embargo el problema principal del cromatograma obtenido, se detalla durante los primeros 5 minutos de análisis, tiempo durante el cual el horno del cromatógrafo se mantuvo en una isoterma de 40°C, que corresponde al límite más bajo de temperatura que tolera la columna; aún a esta temperatura, no se logra la resolución de los picos 3 y 4 que se solapan antes del frente de solvente, estos picos corresponden al metanol y al etilacetato. El último de los compuestos en eluir mediante este método, es el furfural a 13,296 minutos, lo cual indica un tiempo corto de análisis y prometedor método para implementar en la industria.

La columna permite la resolución de varios de los compuestos mediante la metodología propuesta, estudios posteriores en la programación del horno de la columna, el tipo de solvente utilizado y el flujo de gas portador, podrían ayudar a corregir los inconvenientes observados, sin embargo, la baja tolerancia a temperaturas bajas y la necesidad de empezar rampas a menores temperaturas para el trabajo con volátiles, cierra el paso a la posibilidad de resolver los primeros picos con otro tipo de programación de temperatura en el horno. Conseguir una columna con la misma fase estacionaria, pero que sea capaz de soportar menores temperaturas de trabajo, sin que eso represente fallas en la reproducibilidad del tiempo de retención y el área de las señales obtenidas, sería una muy prometedora opción para ejecutar el análisis de metanol y congéneres adecuadamente.

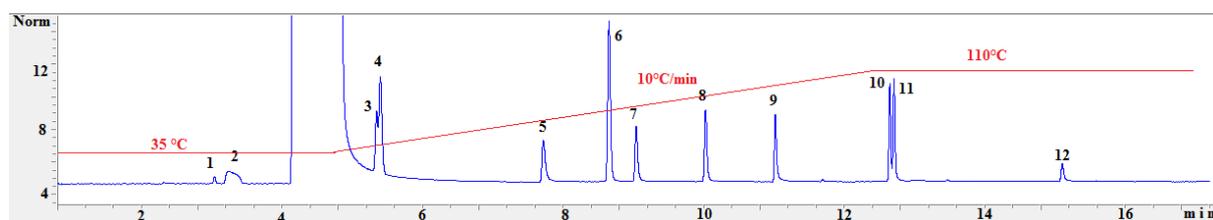
### 3. AT<sup>TM</sup> – AQUAWAX (60 m X 0,25 mm X 0,25 μm)

Buscando mejorar la resolución de la primera sección del cromatograma, se ensayó con una columna que tiene la misma fase estacionaria que la columna HP-INNOWax, pero que presenta un aumento del doble de la longitud anterior, de esta forma el camino que debe recorrer la muestra a través de la columna ejerciendo los fenómenos de adsorción sobre la fase estacionaria son más marcados y probablemente, podría mejorarse la resolución. El rango de temperaturas tolerables es el mismo, por lo tanto, empleando la misma rampa se registró el resultado.

El cromatograma obtenido fue muy similar al presentado en la figura 3, con la diferencia de que en los picos 3 y 4 junto al frente de solvente, se logró una mayor resolución que con la columna HP-INNOWax. El tiempo muerto en la columna, fue alrededor de 17 minutos, el cual es absurdamente alto para los fines industriales en los que se desea aplicar la metodología. Esta característica del ensayo utilizando la columna AT<sup>TM</sup> – AQUAWAX, induce a descartarla como una opción viable. Pudo determinarse entonces, que la fase estacionaria resolvía de forma muy satisfactoria la mayoría de los picos, a excepción del etilacetato y el metanol que eluyen junto al frente de solvente, por supuesto el etilacetato es de una polaridad muy baja, por tanto su retención en la columna es mínima y se solapa con analitos de bajo punto de ebullición como el metanol.

### 4. DB-624 UI (30 m X 0,25 mm X 0,25 μm)

Esta columna de polaridad media, es recomendada por Agilent Technologies para analitos orgánicos volátiles en alimentos y bebidas, así como para analizar solventes orgánicos residuales, características que cumplen algunos de los analitos que se caracterizan como congéneres. Se estableció una temperatura inicial de 35 °C durante 5 minutos, aumentándola hasta 150°C (establecer la temperatura final en 110°C mostró los mismos resultados y redujo el tiempo de enfriamiento del horno para análisis secuenciales) a una rampa de 10°C/min, donde permaneció durante 5 minutos. La figura 4 muestra el cromatograma obtenido superpuesto a la programación de temperatura en el horno mencionada.



**Figura 4.** Cromatograma obtenido con la columna DB-624 UI

La resolución de los picos que se obtuvo en este experimento fue notablemente mayor para el grupo de congéneres en conjunto, que en los ensayos con las columnas anteriores. El tiempo de análisis fue alrededor de 15 minutos, satisfaciendo la necesidad de encontrar un método rápido y analíticamente aceptable en términos de resolución.

Se presenta un inconveniente en la simetría del pico 2 (metanol), que según Valcárcel y Gómez (1988) “puede tener un origen termodinámico, debido a una posible heterogeneidad de los sitios activos en la fase estacionaria y/o a la sobresaturación de la misma, sin embargo, la cinética lenta de los equilibrios de distribución y de otros equilibrios químicos secundarios, puede ser también acreedor de este comportamiento; normalmente esto se produce cuando en la

metodología se presentan puntos de gran actividad en las fases estacionarias, reacciones químicas del compuesto en la columna, volúmenes muertos en el sistema, técnicas de inyección incorrectas”.

El tercer y cuarto compuesto en eluir muestran solapamiento que puede ser resuelto mediante la evaluación de otros parámetros cromatográficos tales como una mayor relación *split* o cambios en la relación del solvente utilizado. Las señales correspondientes a los alcoholes amílicos (picos 11 y 12) a diferencia de las otras columnas evaluadas, no presenta solapamiento notablemente importante, indicando una adecuada interacción de los isómeros con la columna. Por las características anteriores la columna DB-624 UI fue elegida para optimizar el proceso de separación y posterior cuantificación del metanol y congéneres.

### 5.2.3 Técnica de inyección

Dentro de las modalidades de inyección que posee el automuestreador AGILENT ALS G4513A, la modalidad *splitless* mostró ser inadecuada por el aumento en el ancho de los picos cromatográficos, lo cual induce efectos de solapamiento sobre los picos cromatográficos del *i*-propanol con el metilacetato y de los alcoholes amílicos, además de fenómenos de adsorción. Las modalidades *split* en relación 5:1 seguía solapando de manera importante los picos del *i*-propanol con el metilacetato, también se presentan efectos de “cabeceo” en la mayoría de los picos cromatográficos. La relación 7:1 mejora notablemente respecto a las otras modalidades de inyección, conserva efectos de cabeceo leves en 2 de los compuestos analizados.

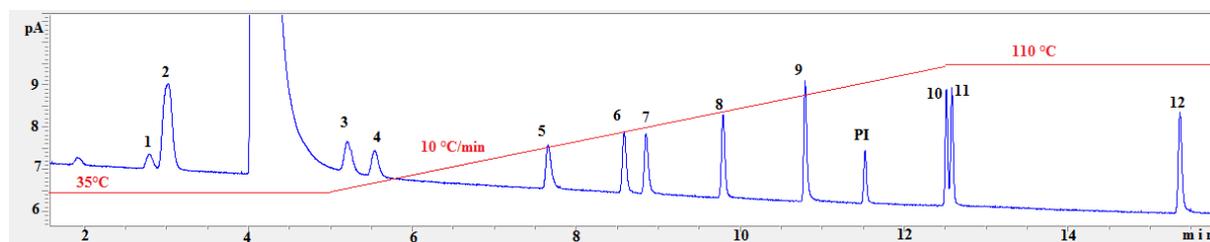
La relación *split* 10:1 muestra picos cromatográficos mucho más simétricos respecto a las demás programaciones en el inyector, eliminando los efectos de solapamiento y de “cabeceo”; esto indica que es una relación adecuada para realizar análisis reproducibles, encontrando que relaciones de *split* más bajas a 7:1 introducen cantidad de muestra muy grande y generan fenómenos de adsorción sobre la fase estacionaria de la columna, que deforman la calidad analítica de la señal. La relación *split* 25:1 además de eliminar por completo el solapamiento de las señales, disminuye el ancho del pico, dando como resultado un aumento en el valor analítico de la resolución total, también mejora de forma muy notable la simetría del pico del metanol, indicando que además de la interacción de este analito con la fase estacionaria, la cantidad de muestra también influye sobre la calidad de la señal.

Sin embargo, hay un inconveniente al comparar esta relación de *split* (25:1) respecto a la relación 10:1, esto es, se da una disminución apreciable en la intensidad de la corriente detectada, por lo tanto el área que integra el software de cuantificación es menor. Las relaciones de *split* mayores a 25 mostraron efectos de “coleo” sobre los picos cromatográficos y una disminución excesiva del área de la señal.

Las relaciones de *split* más favorables fueron: 10:1 y 25:1, es preferible escoger una modalidad de inyección que introduzca más muestra en el sistema cromatográfico, si esto no sacrifica apreciablemente la calidad de las señales y la vida útil de la columna, ya que una cantidad mayor de muestra genera una mayor respuesta en la corriente del detector. Esto tiene una mayor influencia sobre la determinación de los límites de detección y de cuantificación, respuestas más altas a concentraciones más bajas, generan una relación señal/ruido más grande y por tanto límites más bajos.

Una de las técnicas de inyección más interesantes en trabajos actuales de investigación para cromatografía de gases, es el acoplamiento del sistema *split/splitless* a la inyección por headspace, esta técnica permite introducir la muestra al sistema cromatográfico, en estado de

vapor, de manera que de acuerdo a las condiciones que se establezcan, es ideal para el estudio de volátiles (Tian y Rustum, 2016). La figura 5 muestra el cromatograma obtenido tras realizar la inyección por headspace y posterior *split* 10:1, utilizando el automuestreador headspace AGILENT 7697A.



**Figura 5.** Cromatograma obtenido con la inyección por headspace

Puede detallarse lo particularmente resueltos que aparecen los picos cromatográficos respecto al cromatograma obtenido por inyección *split* 10:1 que se muestra en la figura 4, sin embargo, para obtener un cromatograma que visualmente pudiera detectar los doce analitos, fue necesario preparar una solución mucho más concentrada que para las demás modalidades de inyección. Es de esperarse que el vapor que se analiza en la modalidad headspace, y el posterior fraccionamiento en el puerto de inyección en la modalidad 10:1, disminuyan la intensidad de corriente generada en el detector por la inducción de una menor cantidad de muestra al sistema cromatográfico, pero relaciones *split* 7:1 o menores, e incluso en la modalidad *splitless*, mostraron disminución abrupta en la resolución de los picos 1-2 y 3-4, que probablemente se deba a un aumento en el ancho de pico, dado por el incremento en la cantidad de muestra.

El modo headspace representa una importante técnica para introducir muestras al sistema cromatográfico sin necesidad de preparación de las mismas, sin embargo no es recomendable cuando se pretenden establecer límites de detección y cuantificación bajos. Es interesante resaltar sobre la modalidad headspace, que la simetría de los picos, sobre todo la del metanol, mejora de una manera muy conveniente, confirmando lo que reportan Valcárcel y Gómez (1988) donde la deformidad de los picos cromatográficos puede atribuirse a una mala selección en la técnica de inyección del analito.

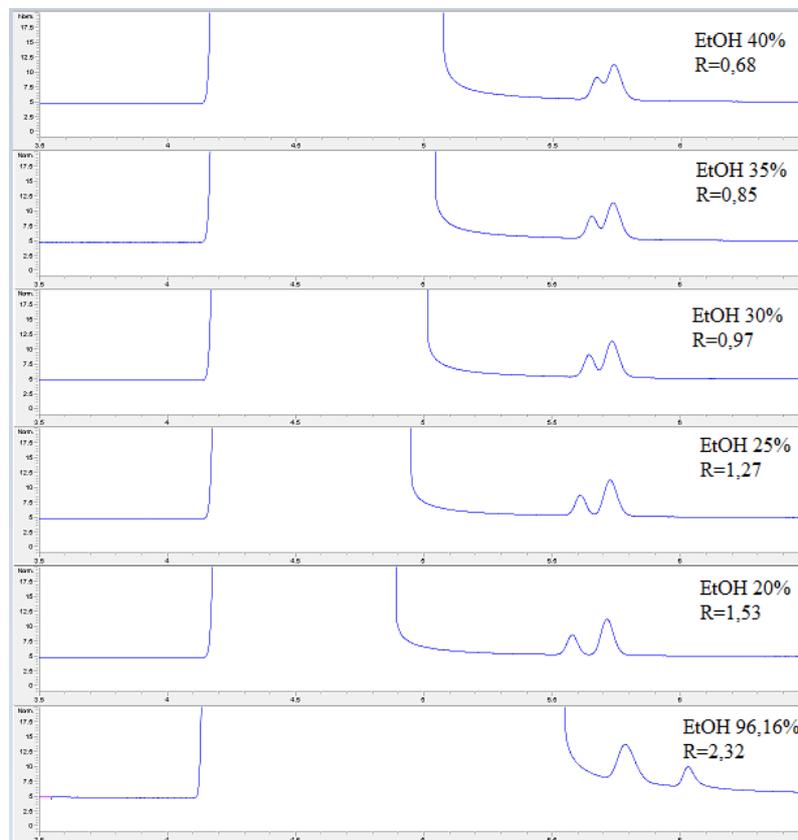
Se escogió el método de inyección mediante el automuestreador AGILENT ALS G4513A en la modalidad *split* 10:1 para futuros análisis.

#### 5.2.4 Efecto del solvente

De acuerdo al procedimiento efectuado con la columna DB-624UI, cuyo cromatograma se observa en la figura 4, es de notar que hay dos compuestos que eluyen en tiempos de retención cercanos al solvente, de hecho, eluyen antes que el pico del solvente caiga a la línea base (cola del pico cromatográfico), la señal del solvente conocida como “frente del solvente” es siempre la más grande en los procedimientos GC-FID, se ensancha o angosta dependiendo de las características del solvente mismo y las dinámicas fisicoquímicas de interacción del solvente con la fase estacionaria.

En algunos procedimientos como GC-MS es posible apagar y encender el detector en la región del frente de solvente para evitar estos inconvenientes, en procedimientos GC-FID esto no es posible debido a que el proceso de encendido del detector, genera abruptamente una señal eléctrica sobre el sistema y desestabilización de la línea base. Como ya se ha mostrado hasta el momento, la cantidad de muestra tiene influencia sobre el ancho de pico, por lo tanto, disminuir

la cantidad de etanol, puede llevar a angostar el frente de solvente y mejorar la resolución de los picos en cuestión. Los resultados de la proporción de etanol utilizada como solvente de las soluciones de metanol y congéneres, se observan en la figura 6.



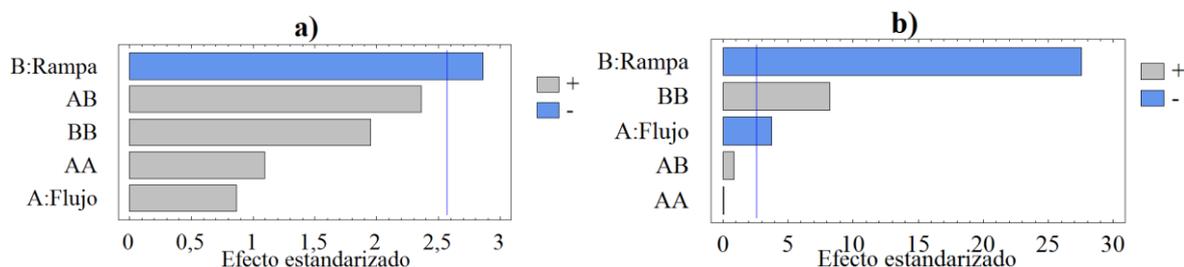
**Figura 6.** Cromatogramas obtenidos para una solución de igual concentración pero aforadas en soluciones etanólicas de diferente proporción.

Las secciones de los cromatogramas que se observan en la figura 6 tienen la misma escala de tiempo y comprenden un rango entre 3,5 minutos y 6,5 minutos. Como era de esperarse, al aumentar el contenido de etanol (EtOH) en la solución, el frente de solvente se ensancha y la resolución de los picos 3-4 disminuye. La solubilidad de los congéneres hasta el etanol 20% en términos de volumen, no se ve afectada y sobre este valor se obtiene una resolución analítica, por lo cual se eligió como solvente de trabajo. Es muy común encontrar en las industrias la elaboración de curvas de calibración disolviendo los analitos en el solvente puro, sin embargo, este estudio demostró que la disolución de los congéneres en el etanol extraneutro rectificado, ensancha demasiado el frente de solvente y, no solo aumenta el tiempo de elución de los compuestos, sino que también disminuye el distanciamiento de los picos 3-4 sobre el solvente, haciendo que su elución se genere sobre la cola del frente de solvente.

### 5.2.5 Diseño experimental para la temperatura del horno y el flujo de gas portador

El diseño factorial utilizado permitió evaluar dos variables de respuesta que se pretendían optimizar en este trabajo, estas dos variables fueron el tiempo de análisis, medido en función del tiempo de elución del último analito y por otro lado, la resolución total de los picos cromatográficos, medido en función de la suma de las resoluciones individuales de cada una de las señales.

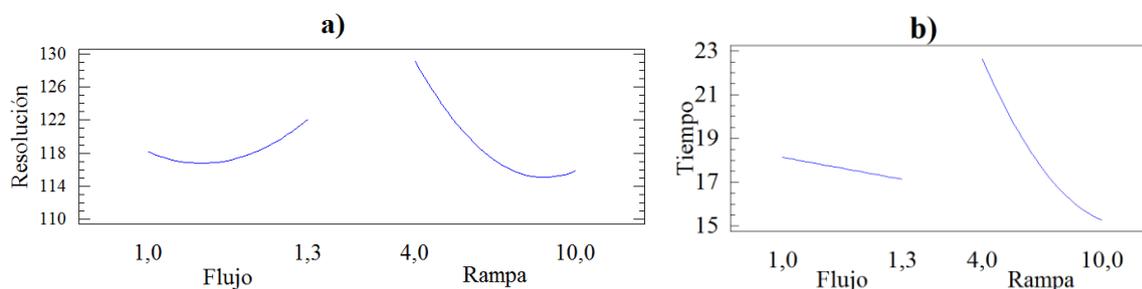
Los resultados de los 11 experimentos sugeridos por el software Statgraphics Centurión versión 16.1.03 (tabla 12), fueron analizados mediante el mismo programa, las respuestas de cada experimento se muestran en el Anexo 3. La figura 7 muestra los diagramas de Pareto obtenidos en función de la resolución total de los picos y en función del tiempo de análisis respectivamente.



**Figura 7.** Diagramas de Pareto obtenidos para a) la resolución total y b) el tiempo de análisis

Puede observarse que el efecto “rampa” influencia la resolución total de manera estadísticamente significativa en el nivel de  $\alpha=0,05$  con los términos del modelo empleado a un nivel de confianza del 95%, a diferencia de los efectos “flujo” y los efectos cuadráticos de “rampa y flujo” cuyos valores de efecto estandarizado son positivos y no son estadísticamente significativos. El diagrama de Pareto de la figura 7, muestra que la rampa tiene una muy importante influencia sobre el tiempo de análisis, sobrepasando el nivel de significancia establecido; el efecto flujo también induce diferencias estadísticamente significativas sobre el tiempo de análisis, al igual que la rampa sus valores de efecto estandarizado son menores a 0, indicando que mayores flujos y mayores rampas, generan menores tiempos de análisis; el efecto de la rampa sobre el tiempo de análisis es más marcado que el del flujo, observándose que su efecto cuadrático también varía significativamente la respuesta aunque de manera positiva.

La figura 8 muestra las gráficas de efectos principales obtenidas para las dos variables de respuesta evaluadas. Por un lado se evidencia que un aumento en el flujo conlleva a una disminución en la resolución, hasta un punto donde la relación se invierte y se detalla un comportamiento directo entre resolución y flujo; el comportamiento en el efecto “Rampa” es más claro, se grafica una recta casi lineal de relación inversamente proporcional a la resolución, es decir que, como era de esperarse, un aumento en la tasa de cambio de la temperatura en el horno, conlleva a una disminución en la resolución total del cromatograma.

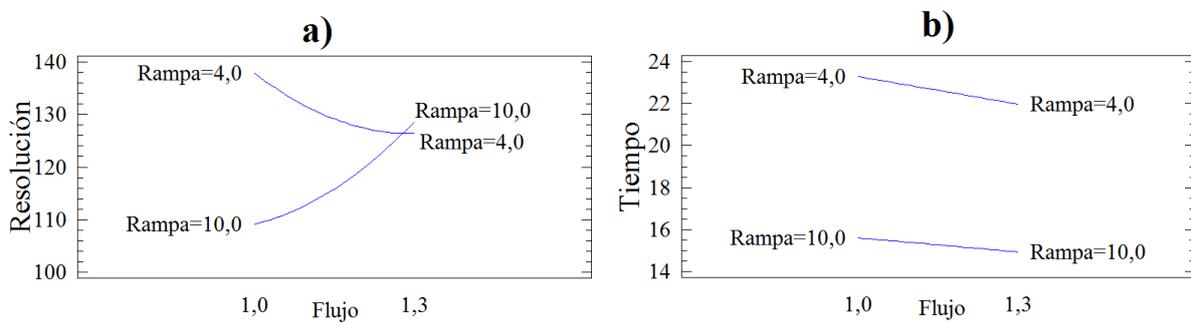


**Figura 8.** Gráficas de efectos principales obtenidas para a) la resolución total y b) el tiempo de análisis

Para el tiempo de análisis, la figura 8 muestra claramente que tanto el flujo como la rampa tienen un comportamiento inversamente proporcional al tiempo de análisis, es decir que tanto mayor sea el flujo y/o la rampa, menor es el tiempo de análisis. El efecto impreso por la rampa sobre la variable de respuesta tiene una pendiente mayor a la del flujo, indicando que su

influencia sobre el tiempo de análisis presenta mayor efecto, lo cual está de acuerdo con la información obtenida en el diagrama de Pareto para el tiempo de análisis de la figura 7.

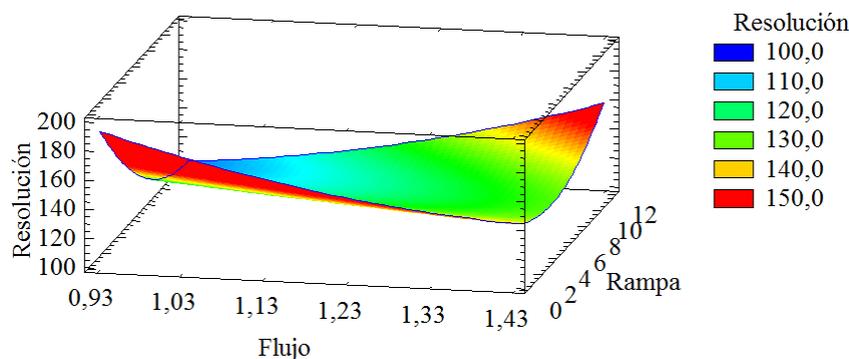
La gráfica de interacción para la resolución total mostrada en la figura 9 sugiere que el efecto del tipo de rampa depende del valor de flujo que se utilice. Para el valor bajo de rampa (4°C/min) un aumento en el flujo conlleva a una disminución de la resolución, para un valor alto de rampa (10°C/min) un aumento en el flujo conlleva a un aumento en la resolución. Este tipo de interacción entre la rampa y el flujo utilizado, respecto a la resolución total, puede tener origen en las propiedades de difusión del gas y su capacidad para eluir adecuadamente los analitos, ya que cambios apreciables en las propiedades del gas (que ciertamente es la fase móvil del método cromatográfico) puede inducir cambios en la afinidad de los analitos en la fase estacionaria de la columna cromatográfica y por ende puede inducir cambio en la resolución de los picos. No es posible determinar si la interacción es estadísticamente significativa como para afectar la resolución total de los picos de manera importante.



**Figura 9.** Gráficas de interacción obtenidas para a) la resolución total y b) el tiempo de análisis

La gráfica de interacción para el tiempo de análisis mostrada en la figura 9, muestra que no se presenta ninguna interacción entre la rampa y el flujo que conlleve a una significancia estadística en el tiempo de análisis. La independencia de los factores corrobora lo mostrado en la gráfica de efectos principales, donde los menores tiempos de análisis se obtienen al aumentar la rampa y el flujo del experimento.

La figura 10 presenta la superficie de respuesta obtenida en el diseño experimental para la resolución total, su forma representa una hoja plegada, los mejores valores de resolución se obtienen sobre la zona roja de la superficie a flujos bajos y menores rampas. Se observa un comportamiento que puede estar relacionado con la interacción de los factores, ya que también se muestra una zona roja más pequeña a valores altos de rampa y flujo.



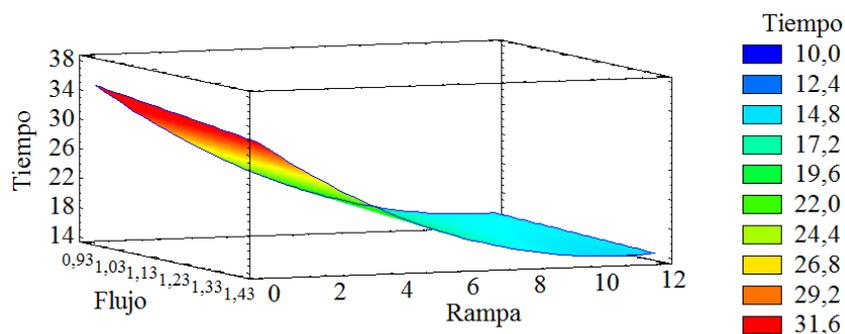
**Figura 10.** Superficie de respuesta obtenida para la resolución total

La ecuación 30 muestra la regresión que ajusta los datos con un estadístico  $R^2$  de 0,788137:

$$R = 462,629 - 415,729F - 30,4158r + 134,16F^2 + 17,2278F \cdot r + 0,599288r^2 \quad (\text{Ec. 30})$$

Donde R es la resolución, F el flujo y r la rampa utilizada.

La figura 11 muestra la superficie de respuesta obtenida para el tiempo de análisis, la forma es nuevamente la de una hoja plegada. Los valores óptimos del tiempo de análisis se encuentran en la zona fría de la superficie, en los vértices que representan valores de rampa y flujo más grandes. La sección azul de la gráfica muestra que los cambios inducidos sobre el eje del flujo son pequeños, a diferencia del eje de la rampa que obliga a la superficie a plegarse con una pendiente más grande.



**Figura 11.** Superficie de respuesta obtenida para el tiempo de análisis

La ecuación 31 muestra la regresión que ajusta los datos con un estadístico  $R^2$  de 0,994146:

$$T = 39,6517 - 5,08722F - 3,67849r - 0,321378F^2 + 0,3577788F \cdot r + 0,145558r^2 \quad (\text{Ec. 31})$$

Donde T es el tiempo de análisis, F el flujo y r la rampa utilizada.

La estimación de los efectos arrojó que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande fue 1,09469 en dos efectos y para los otros efectos fue 1. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1, es decir que el diseño experimental se ajusta adecuadamente al modelo ortogonal.

El análisis de varianza (ANOVA) corrobora lo que concluye el diagrama de Pareto en cuanto a la influencia significativa de la rampa y flujo, además del efecto cuadrático de la rampa, sobre el tiempo de análisis. El  $R^2$  obtenido indica que el modelo ajustado de acuerdo a la ecuación 31, explica un 99,4146% de la variabilidad en el tiempo y que es adecuado para comparar la respuesta con los factores evaluados (rampa y flujo). El bajo  $R^2$  obtenido en la ecuación 30, indica que la resolución de los picos no es adecuadamente evaluada comparando modelos con diferente número de las variables independientes estudiadas.

El diseño de experimentos mostró que la influencia de la rampa en la temperatura del horno, así como el flujo del gas portador, son dos variables muy importantes para optimizar el tiempo de análisis y, menos importante pero aun así a tener en cuenta, para optimizar la resolución total de los picos cromatográficos.

Los procesos de optimización del diseño experimental se realizaron con el objetivo de maximizar la resolución y minimizar el tiempo de análisis. Los resultados depositados en la tabla 20 muestran que los valores óptimos de resolución son los valores bajos del experimento

y que, los valores óptimos de tiempo, están muy cercanos a los valores altos del experimento; es decir, que un proceso de optimización en la resolución total de los picos, conlleva a una disminución en la optimización del tiempo.

**Tabla 20.** Valores óptimos arrojados por el diseño experimental

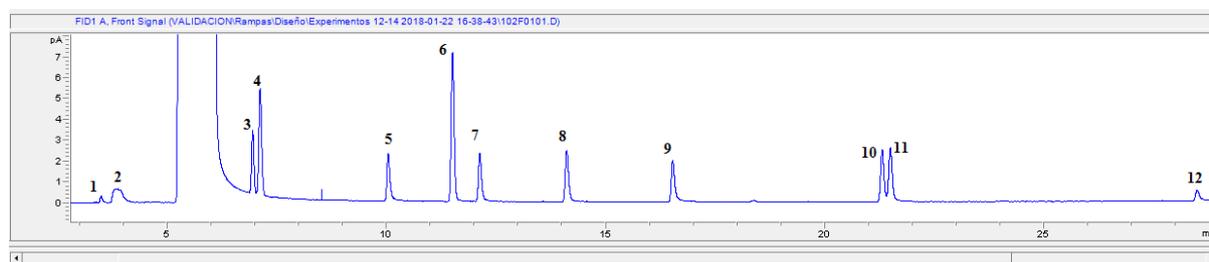
Factor	Bajo	Alto	Óptimo (resolución)	Óptimo (tiempo)
Flujo (mL/min)	0,93787	1,36213	0,93787	1,36213
Rampa (°C/min)	2,7574	11,2425	2,7574	10,9616

Para corroborar lo obtenido con el diseño experimental, se corrieron en el sistema cromatográfico, el experimento 12 y 13, que correspondían a los óptimos para resolución y tiempo respectivamente. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 12 y 13.

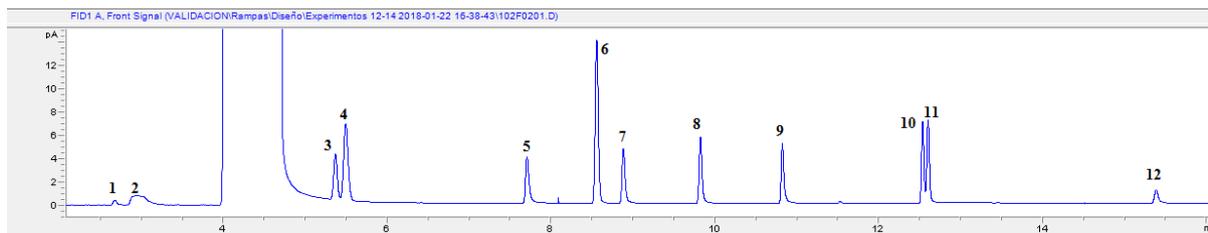
Las figuras 12 y 13 muestran cromatogramas muy similares, la diferencia radica principalmente en el tiempo de análisis y en la resolución de los picos 10 y 11. Considerando las resoluciones individuales del par de picos 10 y 11 que se muestran en la tabla 21, se observa que hay una disminución significativa en su resolución, causada por el aumento en el flujo y la rampa de temperatura. En todos los experimentos, la resolución de los picos 10 y 11 se encuentra por debajo de la resolución analítica ( $R=1,5$ ), por tanto es importante mantenerlo tan cerca de 1,5 como sea posible, ignorando cualquier factor externo.

Con el objetivo de mejorar el tiempo de análisis del experimento 12, se corrió el experimento 14, en el cual se manejaron las condiciones óptimas para el tiempo de análisis durante toda la corrida, excepto la sección en la que eluyen los picos 10 y 11, en esta sección se manejaron las condiciones óptimas para la resolución. Los resultados del experimento 14 mostraron que la resolución se pierde aun cuando se ejecuta la rampa de flujo y de temperatura en conjunto, por lo tanto fue necesario elegir entre los valores óptimos para la resolución y los valores óptimos para el tiempo de análisis.

Debido a la finalidad de este trabajo de implementarse en una entidad industrial, se prefiere ahorro de tiempo sobre calidad analítica, el sacrificio de 0,14 unidades de resolución es justificado con el ahorro de 13,106 minutos en cada uno de los análisis. Para los análisis posteriores se seleccionó el experimento 13 como método de análisis.



**Figura 12.** Cromatograma del experimento óptimo para la resolución



**Figura 13.** Cromatograma del experimento óptimo para el tiempo de análisis

**Tabla 21.** Resolución y tiempo de análisis de los experimentos 12,13 y 14

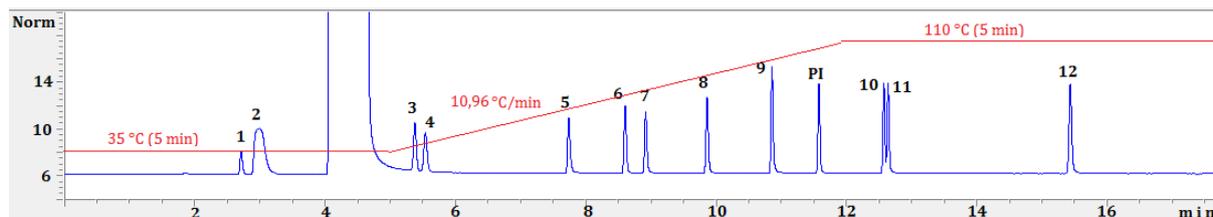
Experimento	Resolución total	Resolución picos 10-11	Tiempo (min)
12	170,46	1,31	28,488
13	156,83	1,17	15,382
14	154,37	1,16	16,268

### 5.3 Elección del patrón interno

En cromatografía de gases y sobre todo, cuando se trabaja con compuestos volátiles, el uso de un estándar interno para cuantificar permite hacer más reproducibles los resultados, además de mantener un control visual de los tiempos de retención de los analitos. Si en el patrón interno se observa algún tipo de desplazamiento en el tiempo de retención, es de esperarse que las señales de los analitos también se vean afectadas en cuanto a su tiempo de retención. La aplicación más interesante es considerando la relación de concentraciones que se mantiene en solución, se busca un patrón interno de características físicas y químicas similares al analito, de manera que cualquier degradación o pérdida de muestra, se presente también en el patrón en efecto, es decir que si por ejemplo, se volatiliza una parte de la muestra, dicha volatilización también se da en el patrón y si se considera la relación de concentraciones, esta ha de mantenerse constante.

De los patrones internos mostrados en la tabla 13, solo los patrones del #1 al #6 mostraron resultados aceptables, los demás afectaban la resolución de alguna de las 12 señales estudiadas en este trabajo. El rango del punto de ebullición de los patrones #1 al #6, comprende temperaturas entre 103°C y 138°C. Teniendo en cuenta que 2 de los 3 últimos congéneres eluyen con un tiempo de retención de 12,5 y 12,6 minutos, es más adecuado un patrón interno que eluya antes y no después de ellos, de esta forma su tiempo de retención estará más cercano al centro del cromatograma, cuantificando adecuadamente a un número mayor de analitos. Es preferible además, que el patrón interno escogido sea un alcohol en vez de un aldehído, ya que 8 de los 12 congéneres son alcoholes y solo uno de ellos, excluyendo el furfural, es un aldehído. Bajo estas condiciones, los mejores patrones internos fueron el 2-pentanol y el 3-pentanol, donde se escogió el 3-pentanol para futuros análisis debido a su menor tiempo de retención, además de justificarse con reportes bibliográficos que muestran su potencial como patrón interno para cuantificar metanol y congéneres (Geroyiannaki *et al.*, 2007).

La figura 14 muestra el cromatograma obtenido para la separación de metanol y congéneres usando el 3-pentanol como patrón interno, así mismo se resumen las condiciones finales que se establecieron como metodología de análisis. Los tiempos de retención de cada señal cromatográfica, pueden ser detallados en el Anexo 10.



Columna: DB-624 UI (6% cianopropil fenilo), inyección a 160°C mediante *split* 10:1  
 Programación en el horno: 35°C (5 min) a 10,96°C/min hasta 110 °C (5 min)  
 Flujo: 1,36 mL/min de Helio, patrón interno: 3-pentanol  
 Temperatura de detector: 160°C, Flujo de aire: 400 mL/min, flujo de hidrógeno: 30 mL/min  
 1: Acetaldehído, 2: Metanol, 3: i-propanol, 4: Metilacetato, 5: n-propanol, 6: etilacetato, 7: s-butanol,  
 8: i-butanol, PI: 3-pentanol, 9: n-butanol, 10: 3-metilbutanol, 11: 2-metilbutanol, 12: Furfural

**Figura 14.** Cromatograma obtenido para la separación de metanol y 11 congéneres usando el 3-pentanol como patrón interno y con el método cromatográfico ya optimizado.

## 5.4 Estandarización y validación de la metodología

### 5.4.1 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

La tabla 22 muestra los límites de detección y cuantificación encontrados, evaluados estadísticamente en términos de coeficiente de variación (CV).

Los límites de cuantificación se utilizaron como punto inicial para elaborar las curvas de calibración futuras, observándose que para la mayoría de ellos el LC se encuentra sobre los 2 mg/L. Para el metanol el LC se estableció sobre 10 mg/L, siendo el más alto de todos los analitos, esto probablemente esté relacionado con una baja respuesta por parte del detector hacia el metanol y por una baja simetría en la señal del compuesto. Los CV obtenidos se encuentran por debajo del 20%, siendo estadísticamente aceptables para esta metodología (Monteiro *et al.*, 2016).

**Tabla 22.** Límites de detección y cuantificación para los congéneres

Congéneres	LD (mg/L)	CV (%)	LC (mg/L)	CV (%)
Acetaldehído	< 1,0	2,9	< 2,0	1,5
Metanol	< 3,0	9,2	< 10,0	9,6
iso-propanol	< 1,0	15,7	< 2,0	4,8
Metilacetato	< 2,0	5,2	< 4,0	7,0
n-propanol	< 1,0	0,0	2,0	3,6
Etilacetato	< 2,0	2,6	< 3,0	12,8
sec-butanol	< 1,0	3,3	< 2,0	0,8
iso-butanol	< 1,0	13,3	< 2,0	0,8
n-butanol	< 2,0	0,9	< 3,0	11,9
3-metilbutanol	< 0,5	5,7	< 2,0	0,7
2-metilbutanol	< 0,5	4,3	< 2,0	2,8
Furfural	< 2,0	2,8	< 4,0	11,8

### 5.4.2 Linealidad y rango dinámico

Los coeficientes de determinación lineal ( $R^2$ ) obtenidos en las curvas de calibración elaboradas de acuerdo a la tabla 16, fueron en todos los casos mayores a 0,998, los procedimientos posteriores de validación también mostraron coeficientes de regresión aceptables. La tabla 23 muestra el coeficiente obtenido después de inyectar relaciones de concentración progresivamente mayores, durante un mismo día.

Puede observarse que los coeficientes son mayores a 0,998, siendo analíticamente aceptables para la metodología (Monteiro *et al.*, 2016). El rango en que se puede trabajar con una linealidad aceptable se conoce como rango dinámico, y de acuerdo a lo obtenido, para la metodología planteada el rango dinámico es de más de 2 órdenes de magnitud, análisis posteriores para concentraciones 5 veces mayor a la última analizada (ejemplo: relación de concentraciones igual a 40 para el acetaldehído), mostró que el  $R^2$  sigue siendo mayor a 0,9999, lo cual corrobora que la linealidad se mantiene por más de dos órdenes de magnitud. El coeficiente de variación de los triplicados de las relaciones de áreas obtenidas para cada uno de los puntos evaluados, fue menor al 8%.

**Tabla 23.** Coeficientes de determinación lineal obtenidos

Analito	Intervalo 1	$R^2$	Intervalo 2	$R^2$	Intervalo 3	$R^2$
Acetaldehído	0,08-2,00	> 0,9995	0,08-4,00	> 0,9996	0,08-8,00	> 0,9999
Metanol	0,40-10,00	> 0,9992	0,40-20,00	> 0,9996	0,40-40,00	> 0,9998
i-propanol	0,08-2,00	> 0,9993	0,08-4,00	> 0,9995	0,08-8,00	> 0,9998
Metilacetato	0,16-4,00	> 0,9993	0,16-8,00	> 0,9995	0,16-16,00	> 0,9996
n-propanol	0,08-2,00	> 0,9993	0,08-4,00	> 0,9994	0,08-8,00	> 0,9998
Etilacetato	0,16-4,00	> 0,9986	0,16-8,00	> 0,9991	0,16-16,00	> 0,9992
s-butanol	0,08-2,00	> 0,9991	0,08-4,00	> 0,9995	0,08-8,00	> 0,9998
i-butanol	0,08-2,00	> 0,9996	0,08-4,00	> 0,9993	0,08-8,00	> 0,9998
n-butanol	0,12-3,00	> 0,9995	0,12-6,00	> 0,9994	0,12-12,00	> 0,9998
3-metilbutanol	0,08-2,00	> 0,9995	0,08-4,00	> 0,9994	0,08-8,00	> 0,9998
2-metilbutanol	0,08-2,00	> 0,9991	0,08-4,00	> 0,9994	0,08-8,00	> 0,9998
Furfural	0,16-4,00	> 0,9992	0,16-8,00	> 0,9993	0,16-16,00	> 0,9998

### 5.4.3 Precisión

La precisión se evaluó para la curva de calibración elaborada de acuerdo a la tabla 16, en el rango de concentraciones del intervalo 1 que se muestra en la tabla 23. La repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad fueron analizadas de acuerdo con lo descrito en la metodología, haciendo uso del software SPSS.

#### 1. Repetibilidad

La tabla 24 muestra la significancia obtenida tras realizar la prueba de Shapiro-Wilk para cada uno de los niveles de concentración, con 9 grados de libertad correspondientes a tres intervalos de tiempo durante un mismo día tenidos en cuenta para realizar un triplicado de cada nivel de concentración, el análisis se realizó en función de la relación de áreas obtenidas.

**Tabla 24.** Significancia obtenida mediante la prueba de Shapiro-Wilk

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,249	0,237	0,459	0,282	0,254	<i>0,031</i>	0,325
Metanol	0,971	0,190	0,403	0,111	0,501	0,533	0,853
i-propanol	0,424	0,383	0,619	0,754	0,178	0,060	0,322
Metilacetato	0,405	0,296	0,268	0,517	0,208	0,219	0,188
n-propanol	0,790	0,534	0,454	0,211	0,135	<i>0,046</i>	0,178
Etilacetato	0,264	0,612	0,847	0,136	0,925	0,281	0,491
s-butanol	0,617	0,250	0,445	0,267	0,872	0,574	0,053
i-butanol	0,525	0,792	0,488	0,159	0,364	0,205	0,305
n-butanol	0,874	0,210	0,625	0,092	0,878	0,135	0,182
3-metilbutanol	0,826	0,178	0,636	0,526	0,204	0,787	0,659
2-metilbutanol	0,989	0,570	0,576	0,873	0,163	0,404	0,287
Furfural	0,178	0,437	0,093	0,351	0,926	0,087	0,388

La relación de áreas para cada nivel y analito puede detallarse en el Anexo 4 (Tablas 1 y 2 respectivamente).

Puede encontrarse que con algunas excepciones (marcadas con cursiva en la tabla 24), las significancias obtenidas mediante la prueba de Shapiro-Wilk son mayores que 0,05, aceptando la hipótesis nula: los datos obtenidos de los triplicados analizados en los tres intervalos de tiempo durante un mismo día, para cada analito, proceden de una distribución normal. Para los datos cuyo valor de significancia es menor a 0,05 indicando no normalidad de los mismos, es posible sugerir que los resultados obtenidos hayan sufrido el efecto de una fluctuación aleatoria, pues carecen de un comportamiento común entre ellos que pudiera atribuirse a algún fenómeno fisicoquímico o error sistemático como volatilización de los analitos o error en la preparación de las soluciones.

El análisis de varianza (ANOVA) arrojó valores de significancia mayores a 0,05, indicando que las medias muestrales correspondientes a la relación de áreas de cada nivel de concentración durante un mismo día, no difieren entre sí, para ninguno de los analitos a un nivel de confianza del 95% (a excepción de los marcados en cursiva en la tabla 24), es decir que el método cuenta con adecuada repetibilidad.

El valor de significancia obtenido se detalla en la tabla 25 (para un valor  $p < 0,05$ ). Los grados de libertad trabajados en el ANOVA fueron 2 para la varianza entre grupos y 6 para la varianza dentro de grupos.

Las tres curvas de calibración trazadas con la respuesta de 7 niveles de concentración (cada uno por triplicado), se evaluaron en función del CV, y como puede detallarse en la tabla 25, hay adecuada repetibilidad del método, pues los valores de CV de la pendiente fueron menores al 3%.

**Tabla 25.** Significancia obtenida por el análisis de varianza ANOVA, CV (%) para las pendientes de las curvas de calibración

Analito	Nivel de concentración							CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Acetaldehído	0,482	0,289	0,177	0,083	0,316	0,327	0,864	1,248
Metanol	0,058	0,727	0,218	0,487	0,167	0,735	0,840	1,401
i-propanol	0,363	0,199	<i>0,039</i>	0,052	0,201	0,897	0,698	1,128
Metilacetato	0,503	0,690	0,169	0,328	0,175	0,148	0,439	2,072
n-propanol	0,108	0,224	0,315	<i>0,009</i>	0,072	0,052	0,459	1,214
Etilacetato	0,191	0,703	<i>0,017</i>	0,187	0,584	0,284	0,270	2,749
s-butanol	0,399	0,888	0,418	0,585	0,193	<i>0,043</i>	0,849	0,909
i-butanol	0,128	0,400	0,680	0,233	0,456	0,129	0,239	0,587
n-butanol	0,785	0,912	0,627	0,069	0,063	0,055	0,800	1,145
3-metilbutanol	0,946	0,164	<i>0,008</i>	0,059	0,197	0,292	0,851	1,079
2-metilbutanol	0,113	0,562	0,230	0,865	0,507	0,680	0,800	0,936
Furfural	0,052	0,607	0,292	0,116	0,812	0,143	0,700	1,130

## 2. Precisión intermedia

La tabla 26 muestra la significancia obtenida tras realizar la prueba de Shapiro-Wilk para cada uno de los niveles de concentración, con 15 grados de libertad correspondientes a cinco días consecutivos tenidos en cuenta para realizar un triplicado de cada nivel de concentración, el análisis se realizó en función de la relación de áreas obtenidas (las tablas 1 y 2 del Anexo 5 muestran respectivamente el promedio y desviación estándar de los datos obtenidos para la precisión intermedia).

**Tabla 26.** Significancia obtenida mediante la prueba de Shapiro-Wilk

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,055	0,228	0,125	0,809	0,268	0,853	0,225
Metanol	0,566	0,179	0,908	0,090	0,461	0,488	<i>0,036</i>
i-propanol	0,784	0,567	0,822	0,510	0,094	<i>0,014</i>	0,863
Metilacetato	0,548	0,273	0,679	0,610	0,834	0,227	0,510
n-propanol	0,541	0,707	0,839	<i>0,004</i>	0,303	0,682	0,868
Etilacetato	0,686	0,644	0,592	0,372	0,802	0,448	0,754
s-butanol	0,292	0,682	0,146	0,460	0,517	0,483	0,413
i-butanol	0,090	0,080	0,422	0,483	0,070	0,920	0,198
n-butanol	0,421	0,987	0,787	0,096	0,460	0,702	0,835
3-metilbutanol	0,505	0,910	<i>0,036</i>	0,579	0,167	0,392	0,111
2-metilbutanol	0,389	0,240	0,880	0,361	<i>0,015</i>	0,990	0,274
Furfural	0,396	1,000	0,061	<i>0,020</i>	0,458	0,214	0,687

Puede encontrarse que con algunas excepciones (marcadas con cursiva en la tabla 26), las significancias obtenidas mediante la prueba de Shapiro-Wilk son mayores que 0,05, aceptando

la hipótesis nula de que los datos obtenidos de los triplicados analizados durante los cinco días consecutivos, para cada analito, proceden de una distribución normal.

El análisis de varianza (ANOVA) arrojó valores de significancia mayores a 0,05, indicando que las medias muestrales correspondientes a la relación de áreas de cada nivel de concentración durante cinco días consecutivos, no difieren entre sí de manera significativa para ninguno de los analitos y por tanto el método presenta una adecuada precisión intermedia. El valor de significancia obtenido se muestra en la tabla 27. Los grados de libertad trabajados en el ANOVA fueron 4 para la varianza entre grupos y 10 para la varianza dentro de grupos.

Las cinco curvas de calibración trazadas (cada una durante un día diferente y consecutivo) con la respuesta de 7 niveles de concentración (cada uno por triplicado), se evaluaron en función del CV, y como puede detallarse en la tabla 27, para todos los analitos la precisión intermedia de la pendiente fue adecuada, pues el valor de CV no excedió el 2,5%.

**Tabla 27.** Significancia obtenida en el ANOVA, CV para las pendientes de las curvas

Analito	Nivel de concentración							CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Acetaldehído	0,614	0,512	0,196	0,262	0,107	0,229	0,709	1,723
Metanol	0,367	0,543	0,117	0,174	0,000	0,816	0,987	1,750
i-propanol	0,761	0,324	0,571	0,135	0,545	0,781	0,446	0,747
Metilacetato	0,104	0,518	0,512	0,070	0,875	0,285	0,420	1,908
n-propanol	0,076	0,746	0,277	0,204	0,780	0,019	0,588	1,428
Etilacetato	0,986	0,747	0,890	0,160	0,994	0,458	0,172	2,201
s-butanol	0,104	0,752	0,160	0,047	0,947	0,092	0,363	0,502
i-butanol	0,751	0,414	0,085	0,178	0,893	0,376	0,444	0,333
n-butanol	0,080	0,289	0,423	0,229	0,954	0,917	0,368	0,659
3-metilbutanol	0,310	0,088	0,105	0,103	0,529	0,888	0,143	0,641
2-metilbutanol	0,462	0,058	0,228	0,071	0,197	0,900	0,142	0,444
Furfural	0,286	0,424	0,942	0,124	0,547	0,969	0,343	2,347

### 3. Reproducibilidad

La tabla 28 muestra la significancia obtenida tras realizar la prueba de Shapiro-Wilk para las pendientes de cada analito, con 15 grados de libertad correspondientes a cinco días no consecutivos tenidos en cuenta para realizar tres curvas de calibración durante cada uno de estos días, el análisis se realizó en función de las pendientes obtenidas.

La tercera columna de la tabla 28 también muestra los valores de significancia obtenidos en el ANOVA realizado para las pendientes evaluadas en función de los días diferentes y no consecutivos (días 1, 4, 8, 15 y 30). Los grados de libertad trabajados en el ANOVA fueron 4 para la varianza entre grupos y 10 para la varianza dentro de grupos. La última columna muestra los CV obtenidos de las mismas pendientes, las 15 pendientes evaluadas no variaron más del 2,5% en ninguno de los casos mostrando que hay buena reproducibilidad en intervalos largos de tiempo.

**Tabla 28.** Significancia de las pruebas de Shapiro-Wilk y ANOVA, CV para las pendientes

Analito	Shapiro-Wilk	ANOVA	CV (%)
Acetaldehído	0,899	0,172	1,319
Metanol	0,159	0,269	1,403
i-propanol	0,058	0,440	1,160
Metilacetato	0,092	0,531	2,418
n-propanol	0,336	0,504	1,189
Etilacetato	0,658	0,349	2,385
s-butanol	0,088	0,116	1,081
i-butanol	0,513	0,597	0,968
n-butanol	0,344	0,112	1,347
3-metilbutanol	0,595	0,288	1,271
2-metilbutanol	0,196	0,738	1,519
Furfural	0,819	0,141	1,524

La prueba de Shapiro-Wilk realizada y su significancia mayor a 0,05 en los casos, indica que los datos de las pendientes obtenidas (el Anexo 6 muestra el promedio de pendiente obtenido en cada uno de los días en que se evaluó la reproducibilidad, cada promedio extraído de tres valores de pendiente registrados durante el mismo día, también se muestra la desviación estándar correspondiente) en intervalos largos de tiempo, provienen de una población normal. El análisis de varianza permite concluir que la reproducibilidad es aceptable dado que no se evidencia diferencia significativa en las medias muestrales de las pendientes obtenidas para cada uno de los analitos.

El método analítico planteado, mostró buena precisión en los tres niveles evaluados (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), indicando que el método de cuantificación mediante curva de calibración por patrón interno, puede ser utilizado confiablemente en intervalos de tiempo cortos, medios y largos.

#### 5.4.4 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el análisis de 5 soluciones o niveles de concentración, cuya “concentración real (C real)” se muestra en la tabla 29, estas soluciones se compararon frente al valor experimental que se obtuvo tras ejecutar el respectivo análisis cromatográfico, este valor también se muestra en la tabla 29 (C exp). La exactitud se midió en función del porcentaje de error relativo (%Error) obtenido para los cinco niveles de concentración en cada analito, los %Error pueden detallarse en el Anexo 7.

Los niveles medio y alto, cuyas concentraciones aún se mantienen dentro de la curva de calibración, muestran buena exactitud pues sus %Error son menores al 7%, el nivel bajo de concentración que está muy cercano al límite de cuantificación de los analitos, muestra una menor exactitud sobre todo para el n-propanol, el i-butanol, el 3-metilbutanol y el furfural, cuyos %Error sobrepasan el 10%; en general se considera que valores menores al 15% de error relativo, son aceptables (Monteiro *et al.*, 2016), es decir que en general el método analítico validado cuenta con una exactitud adecuada para cuantificar los analitos en los rangos de concentración estudiados.

**Tabla 29.** Concentraciones reales y experimentales obtenidas en la determinación de la exactitud

Analito	Nivel de concentración									
	Bajo		Medio		Alto		Muy alto		Muy alto diuído	
	C real	C exp	C real	C exp	C real	C exp	C real	C exp	C real	C exp
Acetaldehído	2,50	2,69	20,00	19,93	45,00	43,46	200,00	203,95	20,00	20,26
Metanol	12,50	12,41	100,00	96,81	225,00	216,34	1000,00	994,74	100,00	99,54
i-propanol	2,50	2,68	20,00	19,14	45,00	42,79	200,00	200,30	20,00	19,87
Metilacetato	5,00	5,11	40,00	37,71	90,00	85,38	400,00	392,96	40,00	37,19
n-propanol	2,50	2,79	20,00	19,11	45,00	43,50	200,00	202,93	20,00	19,51
Etilacetato	5,00	4,88	40,00	37,85	90,00	86,67	400,00	397,38	40,00	36,32
s-butanol	2,50	2,65	20,00	19,18	45,00	43,18	200,00	203,46	20,00	19,53
i-butanol	2,50	2,76	20,00	19,21	45,00	42,84	200,00	204,06	20,00	19,71
n-butanol	3,75	3,99	30,00	28,00	67,50	64,62	300,00	306,46	30,00	28,92
3-metilbutanol	2,50	2,93	20,00	19,05	45,00	43,02	200,00	204,39	20,00	19,42
2-metilbutanol	2,50	2,33	20,00	19,07	45,00	43,41	200,00	198,84	20,00	19,24
Furfural	5,00	5,55	40,00	38,55	90,00	87,92	400,00	406,23	40,00	39,74

C real: concentración real, C exp: concentración experimental media

La solución de nivel muy alto incluido en el estudio de exactitud, se refiera a un dato por fuera de la curva de calibración, 4 veces mayor al último punto de dicha curva, puede observarse que su concentración experimental no difiere en gran medida del “valor real” y de hecho, el %Error obtenido para este nivel es menor al 3%, indicando que el método cuantifica soluciones de manera exacta, aún por fuera de la curva de calibración. Una última solución en el estudio de la exactitud, muestra el efecto de la dilución en las soluciones y la capacidad del método para cuantificar adecuadamente después de realizar este tipo de pretratamiento; la solución de nivel muy alto fue diluida 1:10 y como se muestra en la última columna de la tabla 29, los valores de concentración obtenidos son muy cercanos al “valor real”, indicando que el método sigue siendo exacto para todos los analitos, tras realizar procesos de dilución.

#### 5.4.5 Robustez

La robustez se midió en función de las diferencias encontradas para dos medias experimentales de la relación de áreas obtenida para los 7 niveles de la curva de calibración por dos diferentes analistas, la media de los resultados obtenidos por cada analista, son presentados en la tabla 30 y su desviación estándar en el Anexo 8 (Tabla 2). Para determinar si hay diferencia significativa entre las dos series de datos obtenidas por los dos analistas, se realizó una prueba estadística t para comparar dos medias experimentales. Al realizar esta prueba debe tenerse en cuenta la homogeneidad de las varianzas de cada serie de datos, de manera que se puede formular la hipótesis nula de que no hay diferencias significativas entre las dos medias experimentales de las relaciones de áreas para cada nivel y analito, asumiendo que cada serie de datos tiene o no una varianza homogénea. El valor de significancia de la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de las varianzas se muestra en el Anexo 8 (Tabla 1), donde se acepta la hipótesis nula.

La tabla 31 muestra los valores de significancia obtenidos al realizar la prueba t para comparar las medias experimentales obtenidas por cada analista, puede observarse que con algunas excepciones, la significancia obtenida es mayor o igual 0,05 indicando que no hay diferencias significativas entre las medias experimentales de la relación de áreas obtenidas para cada nivel y analito por los dos diferentes analistas en efecto.

Determinar que el método de análisis es robusto en cuanto a los operarios que lo ejecutan, representa una ventaja para el trabajo en equipo y para los entes industriales en los que la rotación del personal es frecuente. Teniendo en cuenta a la entidad para quien se realizó la validación, el método de análisis cromatográfico para determinar metanol y congéneres mediante cromatografía de gases, puede ser ejecutado por personal independiente a quien lo validó sin arriesgar la calidad de los resultados, es decir que diferentes analistas que ingresen a trabajar al laboratorio de control de calidad de la Industria Licorera del Cauca, en principio estaría capacitado para realizar el análisis correspondiente.

**Tabla 30.** Promedio de relación de áreas obtenido por cada analista para cada nivel y analito en la medida de la robustez

Analito	Analista	Nivel de concentración						
		1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	1	0,04554	0,08203	0,13764	0,23117	0,36676	0,50576	0,66257
	2	0,03990	0,07424	0,13138	0,23058	0,36518	0,47739	0,65018
Metanol	1	0,32315	0,57623	1,05322	1,82286	2,94542	4,07199	5,40179
	2	0,34411	0,55286	1,01040	1,82412	2,95103	3,89161	5,30605
i-propanol	1	0,11921	0,19046	0,31713	0,53429	0,84959	1,16084	1,54181
	2	0,11089	0,18057	0,51525	0,53604	0,81178	1,11039	1,52327
Metilacetato	1	0,08451	0,14737	0,27549	0,47047	0,77489	1,05273	1,42406
	2	0,08266	0,14479	0,28094	0,51451	0,77144	1,06296	1,42406
n-propanol	1	0,09663	0,17757	0,32666	0,61043	0,93464	1,30709	1,76085
	2	0,06472	0,17369	0,30710	0,56820	0,90267	1,26258	1,71377
Etilacetato	1	0,10369	0,18811	0,33526	0,58369	0,96803	1,32331	1,79333
	2	0,08515	0,17542	0,33886	0,62189	0,94831	1,33970	1,81420
s-butanol	1	0,10047	0,15805	0,31165	0,57486	0,93616	1,30871	1,75580
	2	0,07180	0,16420	0,30994	0,57050	0,88573	1,25159	1,70790
i-butanol	1	0,10603	0,19689	0,38065	0,71331	1,10210	1,51144	2,04611
	2	0,08448	0,18057	0,37749	0,67729	1,04065	1,45900	2,00394
n-butanol	1	0,12585	0,22630	0,44914	0,90362	1,46555	2,04794	2,73827
	2	0,10438	0,22789	0,46798	0,86970	1,43384	1,89470	2,69952
3-metilbutanol	1	0,09199	0,17384	0,34929	0,63593	1,05629	1,47732	1,99056
	2	0,07815	0,16641	0,33758	0,63054	1,00516	1,41674	1,93805
2-metilbutanol	1	0,12518	0,22364	0,42009	0,74070	1,17011	1,61915	2,17040
	2	0,11544	0,21315	0,40198	0,73466	1,17983	1,54818	2,15210
Furfural	1	0,14559	0,25703	0,51966	0,98085	1,59306	2,23477	2,98375
	2	0,10258	0,25532	0,48367	0,95278	1,48000	2,16197	2,91260

**Tabla 31.** Significancia obtenida para la prueba t

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,247	0,050	0,124	0,899	0,820	0,020	0,177
Metanol	0,685	0,380	0,051	0,974	0,928	0,062	0,030
i-propanol	0,240	0,163	0,805	0,863	0,049	0,069	0,278
Metilacetato	0,369	0,272	0,441	0,008	0,811	0,453	0,100
n-propanol	0,035	0,790	0,129	0,081	0,034	0,287	0,060
Etilacetato	0,087	0,236	0,671	0,055	0,238	0,182	0,358
s-butanol	0,074	0,559	0,854	0,714	0,086	0,084	0,056
i-butanol	0,008	0,189	0,762	0,248	0,064	0,243	0,225
n-butanol	0,269	0,944	0,202	0,156	0,329	0,001	0,150
3-metilbutanol	0,027	0,166	0,172	0,711	0,214	0,127	0,013
2-metilbutanol	0,355	0,451	0,082	0,830	0,653	0,011	0,616
Furfural	0,010	0,951	0,054	0,236	0,023	0,305	0,076

### 5.5 Estabilidad térmica de las soluciones

La determinación de la precisión demostró que preparar las soluciones a partir de la misma solución madre (Tabla 14) no genera inconvenientes sobre los resultados obtenidos, es decir que las condiciones de almacenamiento de la solución madre, fueron adecuadas para mantenerla estable durante el tiempo incurrido, el almacenamiento a temperaturas bajas y en recipiente ámbar permite para efectos de la industria, evitar la tarea de preparar la solución stock a partir del estándar directamente, sin embargo es recomendable hacer esto último cada dos meses que es el tiempo que se utilizó la solución en este trabajo, o en su defecto, hasta que la solución madre muestre síntomas de degradación.

Es importante recordar que el trabajo se realizó con analitos volátiles, es decir que probablemente en condiciones ambientales hayan efectos de volatilización, de ahí la importancia de utilizar un patrón interno que reduzca la influencia de estos efectos sobre los resultados. El análisis de una curva de calibración completa, una vez se ha dejado sobre el automuestrador ALS AGILENT G4513A, realizando cada punto de la curva por triplicado, tarda alrededor de 8 horas con el método cromatográfico establecido, esto es lo que tarda el cromatógrafo de manera automática en analizar 22 muestras, 21 de ellas correspondientes a 7 niveles de calibración, cada uno por triplicado y la muestra restante correspondiente al blanco, es importante resaltar que no solo se está considerando el tiempo que tarda en obtenerse el cromatograma, sino también el que tarda el horno de la columna en disminuir nuevamente la temperatura para iniciar el siguiente análisis. El automuestrador ALS AGILENT G4513A carece de sistema de refrigeración y es posible que en 8 horas alguno de los volátiles se haya evaporado de manera significativa, de ahí la importancia de analizar la estabilidad de los analitos durante intervalos de tiempo muy cortos.

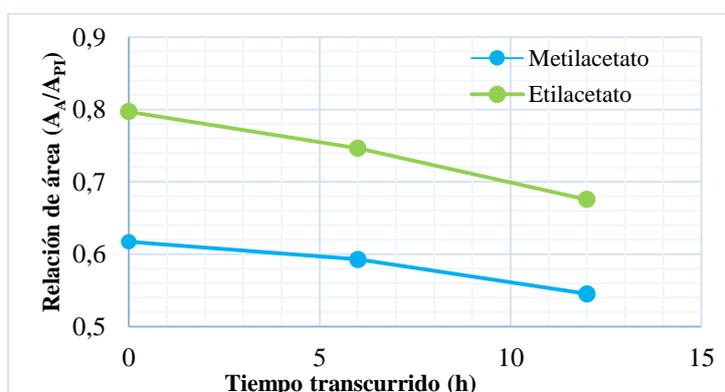
Se analizó la estabilidad en base a la respuesta del nivel 5 de la curva de calibración una vez depositado en el vial y puesto en el automuestrador ALS AGILENT G4513A. Un primer vial fue analizado por duplicado y al cabo de 6 horas fue nuevamente analizado por duplicado, un segundo vial fue analizado por duplicado y al cabo de 12 horas fue nuevamente analizado por duplicado. La tabla 32 muestra los valores de significancia al comparar el par de series de datos

obtenidos mediante una prueba t con 2 grados de libertad, así como el coeficiente de variación de los 4 valores de relación de áreas obtenidos para las dos series de datos.

**Tabla 32.** Significancia para la prueba t de la estabilidad, CV para la estabilidad a 6 y 12 horas

Analito	6 Horas		12 Horas	
	t	CV (%)	t	CV (%)
Acetaldehído	0,957	1,121	0,840	1,528
Metanol	0,136	0,519	0,320	0,388
i-propanol	0,387	0,363	0,341	0,481
Metilacetato	0,192	3,487	0,053	6,805
n-propanol	0,351	0,953	0,715	2,037
Etilacetato	0,045	4,903	0,012	10,124
s-butanol	0,217	0,338	0,326	0,877
i-butanol	0,370	0,283	0,480	0,818
n-butanol	0,260	0,760	0,967	2,010
3-metilbutanol	0,512	0,611	0,599	1,095
2-metilbutanol	0,929	2,212	0,896	2,152
Furfural	0,729	1,337	0,980	1,751

Los valores de significancia obtenidos al realizar la prueba t para dos medias experimentales, comparando la solución del vial a las 6 horas y a las 12 horas de un primer análisis, indican que el etilacetato disminuye su relación de área de manera significativamente importante a las 6 y 12 horas de análisis, es decir que la concentración que se analiza al realizar la curva de calibración al cabo de un tiempo corto de espera, es probablemente menor a la que se introduce en el software de cuantificación, esto tiene repercusiones sobre la exactitud del método. Los valores de CV obtenidos son bajos a excepción del metilacetato y el etilacetato, cuyos valores son cercanos al 3,5 y 5% respectivamente para las 6 horas, y cercanos al 7 y 10% respectivamente para las 12 horas, la figura 15 permite apreciar de forma más clara la pérdida de analito en el vial por evaporación para el metilacetato y el etilacetato. Los resultados sugieren que la falta de refrigeración sobre el sistema de inyección automática, genera un error permanente en los análisis que sobrepasen las 6 horas, evento que se presenta al realizar curvas de calibración.



**Figura 15.** Disminución en la relación de áreas de analito y patrón interno ( $A_A/A_{PI}$ ) en función del tiempo transcurrido

## 5.6 Examen de aptitud

En la tabla 33 se muestran los %Error obtenidos al comparar la media de la concentración obtenida para tres muestras de la Industria de Licores del Caldas, frente a la concentración reportada por la misma organización. Los datos de concentración experimental y reportada se pueden encontrar en el Anexo 9.

El análisis mediante la metodología planteada en el laboratorio de la Industria Licorera del Cauca, mostró buena exactitud para muestras externas al laboratorio donde se validó la metodología; se manejaron dos grupos de analitos, en el primero se agruparon el acetaldehído, metanol, i-propanol, furfural, 2-butanol y butanol, en el segundo se agruparon el n-propanol, i-butanol, 3-metilbutanol, 2-metilbutanol y el etilacetato. El primer grupo tenía una menor concentración en las muestras que el segundo grupo, para las muestras de nivel bajo, medio y alto, estas concentraciones correspondieron a 10, 20 y 40 mg/L respectivamente. Las concentraciones reales del segundo grupo, fueron 150, 250 y 350 mg/L para los niveles bajo, medio y alto respectivamente. Para el análisis de la segunda concentración, se diluyeron las muestras 1:10 mL para que cayeran dentro de la curva de calibración y posteriormente se aplicó el factor dilución para hallar la concentración experimental. Los %Error obtenidos fueron menores al 15% (expresados en valor absoluto), indicando que son analíticamente aceptables y que el método analítico validado es apto para implementarse en laboratorios externos al de la Industria Licorera del Cauca.

**Tabla 33.** %Error obtenidos en el examen de aptitud

Analito	Nivel		
	Bajo	Medio	Alto
Acetaldehído	1,22655	1,89745	5,20281
Metanol	6,73470	0,50883	3,21286
i-propanol	2,77180	2,00958	0,42267
n-propanol	0,72030	1,04524	1,25094
Etilacetato	3,39591	1,76559	1,74334
s-butanol	1,23805	0,33385	2,41644
i-butanol	0,90329	0,89348	1,25933
n-butanol	3,04900	0,14595	2,05060
3-metilbutanol	12,87006	1,18847	0,10011
2-metilbutanol	7,50295	2,95087	1,93880
Furfural	0,31480	0,35050	2,07890

## 5.7 Implementación del método en muestras de la Industria Licorera del Cauca

La tabla 34 muestra el contenido de metanol y algunos congéneres expresado en mg/L, de productos y materias primas de la Industria Licorera del Cauca (ILC). Los productos y materias primas examinadas, comprenden un amplio rango de fechas de producción y/o adquisición de la materia prima, razón por la cual componen un muestreo aleatorio y significativo.

**Tabla 34.** Contenido de metanol y algunos congéneres en materias primas y productos de la ILC

Clase de bebida	Alcohol Soderal	Alcohol ILC	Agte Tra	Agte S/A	Tafia ILC	Ron Gorgona	Ginebra ILC
n	7	6	5	5	7	7	3
Acetaldehído	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	54,6 ± 3,0	69,8 ± 4,7	N.D.
Metanol	N.D.-11,5	N.D.	N.D.	N.D.	63,4 ± 4,3	129,2 ± 14,5	N.D.
i-propanol	N.D.-2,5	N.D.-2,8	< LC	< LC	14,2 ± 0,06	15,3 ± 1,6	< LC
n-propanol	N.D.	N.D.-2,1	N.D.	N.D.	192,1 ± 3,8	207,3 ± 18,9	N.D.
Etilacetato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	804,8 ± 22,8	388,9 ± 107,2	N.D.
i-butanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	242,4 ± 5,9	207,6 ± 21,9	N.D.
n-butanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	115,2 ± 13,3	220,5 ± 21,6	N.D.
3-metilbutanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	738,5 ± 27,2	632,2 ± 35,8	N.D.
2-metilbutanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	177,7 ± 14,7	175,9 ± 14,6	N.D.

Agte Tra: Aguardiente Tradicional; S/A: sin azúcar; N.D.: No Detectable

El alcohol comprado a proveedores externos, antes de ser aceptado es evaluado cromatográficamente en la ILC de manera que se confirme su cumplimiento con la normativa nacional vigente. La tabla 34 es testigo del contenido de metanol y congéneres por debajo de los niveles permisibles en la NTC 620 (estos niveles son los indicados en la sección 2.3.2). Una vez se ha adquirido esta materia prima, se deposita en cubas de almacenamiento donde permanecen hasta su posterior utilización.

De la tabla 34 puede detallarse que el alcohol almacenado en las cubas, también cumple con la NTC 620, que permite un contenido de alcoholes superiores expresados como i-propanol, de hasta 5 mg/L alcohol anhidro, normalmente el i-propanol es el único congénere que se observa en los cromatogramas del alcohol utilizado en la elaboración de las bebidas alcohólicas.

Los aguardientes caucano tradicional y sin azúcar, que están elaborados a partir de alcohol extraneuro rectificado, como es de esperarse, no contienen metanol y congéneres a excepción del i-propanol, que se encuentra en niveles por debajo del límite de cuantificación y ciertamente, cumple con la normativa vigente. La ginebra que también se elabora en base al alcohol extraneuro rectificado de las cubas de almacenamiento, tampoco contiene niveles de metanol o congéneres cuantificables, el único que se detecta en los análisis es el i-propanol.

El análisis de metanol y congéneres muestra ser una herramienta más importante en el control de calidad del ron que se elabora en la ILC debido al contenido de los mismos, que puede apreciarse en la tabla 34. El ICONTEC establece niveles permisibles máximos de 100, 200, 1000 y 10000 mg/L de metanol, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores respectivamente. El contenido de estos analitos en la tafia, se ajusta a lo indicado por la normativa vigente, asegurando la calidad de los productos que se elaboren con base en esta materia prima.

Los niveles de congéneres en el ron, deben sobrepasar los 250 mg/L alcohol anhidro, expresados como la sumatoria adimensional de dichos congéneres. Los niveles máximos permisibles son 300, 400, 10000 y 3000 mg/L de metanol, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores respectivamente. De la tabla 34 puede corroborarse que el contenido de metanol y congéneres en el ron, se encuentra adecuadamente regido por la normativa vigente y garantiza la calidad del mismo.

Es importante resaltar que la tafia contiene mayores concentraciones de metanol y congéneres, sin embargo debido al modo en que se expresan (todos divididos entre litro de alcohol anhidro), los contenidos mostrados en la tabla 34 dan la impresión de que tanto el ron como la tafia contienen niveles parecidos de estos compuestos. El grado alcoholimétrico de la tafia es alrededor de 65%, mientras el del ron es cercano al 35%, las concentraciones de metanol y congéneres que se obtengan directamente, son multiplicadas por el factor (100/65 y 100/35) para la tafia y el ron respectivamente, razón por la cual el contenido mostrado en la tabla 34 no diferencia en gran medida la materia prima del producto terminado.

Los alcoholes amílicos mostraron ser los congéneres más abundantes en el ron, dejando de lado el etilacetato cuya concentración varía de manera significativa de muestra en muestra; esta variación tiene que ver con la tendencia del etilacetato a evaporarse y la baja capacidad del solvente (etanol 35% en el caso del ron) para retener dicho congénere en la solución.

La tabla 35 muestra el contenido en mg/L de alcohol anhidro de algunas bebidas adulteradas que fueron proporcionadas por la Policía Nacional del municipio de Popayán, así como algunas muestras de ron elaboradas por diferentes empresas.

Uno de los resultados más importantes que se obtuvieron fue la capacidad de la metodología validada en la identificación de bebidas adulteradas bajo el nombre de productos de la ILC como los aguardientes caucano tradicional y sin azúcar. La tabla 35 muestra que, diferente a lo que deben cumplir de acuerdo a la NTC 411, los aguardientes adulterados contienen valores de metanol por encima de 100 mg/L alcohol anhidro y diferente también a los productos de la ILC estas bebidas adulteradas si presentan contenidos detectables de congéneres.

**Tabla 35.** Contenido de metanol y algunos congéneres en productos externos a la ILC

Clase de bebida	Agte Tra	Agte S/A	Ron 1	Ron 2
n	3	3	3	3
Acetaldehído	7,50-10,18	2,84-9,15	82,77 ± 1,36	230,02 ± 4,26
Metanol	0-474,55	N.D.	N.D.	N.D.
i-propanol	< LC-7,16	N.D.	N.D.	N.D.
n-propanol	N.D.	N.D.	420,93 ± 5,56	55,78 ± 2,39
Etilacetato	N.D.	N.D.	262,41 ± 17,68	100,34 ± 14,61
i-butanol	< LC	N.D.	284,92 ± 11,25	36,44 ± 0,78
n-butanol	N.D.	10,97-13,53	132,25 ± 12,58	130,89 ± 3,57
3-metilbutanol	< LC	N.D.	423,59 ± 5,01	84,93 ± 1,73
2-metilbutanol	< LC	N.D.	151,59 ± 6,20	15,32 ± 2,15

Ya se había merodeado sobre sobre la utilidad de la metodología planteada para las pruebas de control de calidad del ron Gorgona elaborado por la ILC, esto se corrobora mediante los resultados obtenidos para los rones 1 y 2 que corresponden a diferentes lotes de muestras de ron de industrias licoreras externas a la del Cauca. Puede detallarse la utilidad para diferenciar el ron Gorgona de otros rones mediante las características mostradas en la tabla 34, sugiriendo un control de calidad directo sobre el ron mediante la implementación de una metodología cromatográfica para regular las propiedades aromáticas que le confieren los congéneres al producto.

Establecer un procedimiento para el control de calidad del ron Gorgona, ciertamente representaría un reto para toda la ILC, pues sería necesario controlar todo el proceso de

elaboración de la bebida alcohólica, además de coordinar también aspectos administrativos. Dos parámetros que podrían potenciar esta posibilidad son: 1) Recordando que la tafia utilizada como materia prima para la elaboración del ron, es adquirida de un proveedor externo que debe cumplir con las exigencias de calidad indicadas por el cliente, puede establecerse un rango de aceptación de materia prima, donde se incluya como su nombre lo indica, un rango de concentraciones definidas para el metanol y congéneres, como parámetro de aceptación, esto ya se ha realizado antes por la ILC, aunque el precio de la tafia aumenta, el proveedor es capaz de garantizar ciertos niveles de los analitos en cuestión. 2) Si después de realizar la recepción de la materia prima, esta se procede a almacenar, el proceso de añejamiento seguirá su curso y por tanto cuando se utilice para elaborar la bebida alcohólica, no contendrá los niveles de metanol y congéneres garantizados por el proveedor, de manera que el control de calidad sobre el producto terminado, será nuevamente deteriorado, es decir que inmediatamente se realice la recepción, debe procederse a elaborar la bebida alcohólica.

El control de calidad sobre el ron Gorgona tal y como se describió anteriormente, es efectivamente posible, pero sería necesario realizar un estudio de viabilidad financiera para determinar si es posible ejecutarlo. Los proveedores de la tafia son capaces de garantizar rangos fijos en las concentraciones de metanol y congéneres, pero esto sugiere un aumento considerable en el costo de la materia prima, entre más angosto el rango de concentraciones exigido, mayor es el precio de la tafia, además, ya que la ILC es una industria más enfocada hacia la producción de aguardiente que de ron, eliminar los procesos de almacenamiento de tafia significaría realizar varias compras pequeñas de la materia prima, evento que aumentaría su costo de compra y aumentaría el trabajo administrativo.

Un control de calidad más enfocado a registrar las propiedades adquiridas en cada lote de producto terminado, sin que eso signifique necesariamente una formulación que lleve hacia niveles fijos de metanol y congéneres en el ron, es precisamente el de realizar registros cromatográficos de cada lote de producción, donde se muestre la concentración de metanol y congéneres adquirida en un conjunto de muestras adecuadamente representativo para cada lote, es decir que cada lote que se lance al mercado, tendrá unas características organolépticas conferidas por el metanol y los congéneres, que son conocidas y cuantificables (en unidades de concentración). Si se desea contrastar un ron Gorgona presuntamente adulterado, frente a uno cuyo lote es ciertamente definido, basta con analizar dicho ron mediante la metodología validada y comparar los resultados con los registros cromatográficos almacenados para su lote de producción respectivo.

La utilización del patrón interno mejora entre otras, la exactitud en la cuantificación de metanol y congéneres en muestras de bebidas alcohólicas o de las materias primas que se utilizan en su fabricación, esto es, una vez se destapa la muestra real, extraer una alícuota y añadir el patrón interno, permite cuantificar los analitos sin ver tan afectados los resultados por pérdidas mediante volatilidad de dichos analitos (especialmente los ésteres). Se sugiere buscar otro patrón interno debido a que se encontró un contenido apreciable de este analito en las muestras de tafia y las de ron. También es muy importante aplicar el patrón interno en la elaboración de la curva de calibración, para disminuir los efectos de pérdida de analito que se observan claramente en la figura 15. Otra ventaja en la implementación del patrón interno, es la regulación del tiempo de retención de los analitos en los cromatogramas, es decir, pueden detectarse fluctuaciones en el sistema cromatográfico cuando se genere un corrimiento en el tiempo de retención del patrón interno, evento que requeriría de un procedimiento de estabilización de dicho sistema cromatográfico.

## 6. Conclusiones

- Se diseñó un método analítico para la cuantificación de metanol y congéneres mediante cromatografía de gases donde los valores óptimos de flujo de gas portador y rampa en el horno de la columna fueron 1,36 mL/min y 10,96 °C/min respectivamente, la columna DB-624 UI utilizada mostró buenos resultados en cuanto a la capacidad para resolver los analitos y la inyección mediante el automuestrador ALS AGILENT G4513A fue preferible sobre la inyección Headspace para mantener límites de cuantificación más bajos.
- Se adquirieron límites de detección por debajo de 2 mg/L y límites de cuantificación por debajo de 4 mg/L para la mayoría de los analitos, con excepción del metanol cuyos LD y LC fueron 3 y 10 respectivamente.
- El coeficiente de determinación lineal en el rango de concentraciones trabajado, muestra valores mayores a 0,9980 siendo analíticamente aceptables. El coeficiente se mantiene cuando el rango dinámico se amplía a valores de concentración 4 veces mayor a la del último punto de la curva de calibración, permaneciendo lineal en un rango de hasta dos órdenes de magnitud.
- Se obtuvo buena precisión de la metodología en intervalos de tiempo cortos, intermedios y largos, mostrando CV menores al 10% para las pendientes obtenidas, y significancias mayores a 0,05 de acuerdo con el análisis de varianza realizado sobre los triplicados de la relación de áreas obtenidas para cada nivel y analito, así como buena exactitud encontrando porcentajes de error relativo menores al 15% para los niveles de concentración evaluados.
- El método mostró robustez frente al cambio de analista, evidenciándola con valores de significancia mayores a 0,05 para el análisis mediante una prueba estadística t de dos medias experimentales, también mostró aptitud frente a muestras externas al laboratorio de control de calidad de la Industria Licorera del Cauca, generando porcentajes de error relativo menores al 15%.
- Se validó una metodología analítica para la determinación de metanol y congéneres mediante cromatografía de gases con detección de ionización por llama en el equipo AGILENT 7890B del área de control de calidad de la ILC, esta metodología representa una muy útil e importante herramienta para el control de calidad de los productos de la empresa, resaltando su desempeño en el análisis del ron gorgona y los licores adulterados.
- El alcohol extraneutro rectificado usado por la ILC como materia prima para elaborar algunos de sus productos, así como los productos que manufactura, cumplen con los requisitos de calidad vigentes depositados en las Normas Técnicas Colombianas.

## 7. Recomendaciones

- Debido a la volatilidad encontrada para el metilacetato y el etilacetato en el medio trabajado, es recomendable mantener el ambiente del área de cromatografía lo más frío posible, la instalación de un sistema de aire acondicionado sería una buena opción.
- El 3-pentanol mostró ser un patrón interno adecuado para la cuantificación de metanol y congéneres en muestras de alcohol rectificado extraneuro y muestras de aguardiente caucano y ginebra, pero en las muestras de ron el 3-pentanol está presente, razón por la cual debe buscarse un patrón interno más adecuado para las muestras de ron.
- En los blancos de la curva de calibración se detecta siempre una cantidad de i-propanol apreciable, esto influye de manera importante en la determinación de sus parámetros de validación así como en la cuantificación de dicho analito, es recomendable a futuro, trabajar los estándares en soluciones de etanol grado cromatográfico.
- En términos de validación, la metodología planteada es útil para el control de calidad del alcohol extraneuro rectificado, y los productos que se elaboren a partir de él, el ron que se prepara a partir de la tafia en ocasiones podrá salirse de los extremos de la curva de calibración usando la dilución 1:10 mL, por lo cual es recomendable verificar que los resultados que se obtengan mediante el software del cromatógrafo antes de aplicar los factores de dilución, se encuentren dentro del rango de la curva de calibración de manera que se garantice su precisión, exactitud, robustez y aptitud.
- La metodología validada mostró un gran potencial en la regulación del nivel de metanol y congéneres en el ron Gorgona, se recomienda explotar este potencial mediante un seguimiento más amplio de los lotes de producción o un análisis de un conjunto mucho más grande de muestras ( $n > 500$ ), esto con el fin de establecer de manera más global los “límites internos” de estos compuestos que se toleren como valores promedio o valores aceptables en esta bebida para que conserven siempre las mismas características organolépticas conferidas por dichos compuestos.
- Para fines prácticos, es más recomendable la instalación de un compresor de aire que alimente el equipo de cromatografía de gases con el combustible en el sistema de detección por ionización de llama, que instalar continuamente cilindros de aire sintético.

## 8. Bibliografía

- AGILENT. (2012). *Agilent J&W GC Column Selection Guide*, 258-264. Recuperado el 15/08/2018 desde: [https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5990-9867EN\\_GC\\_CSG.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf)
- Apostolopoulou, A., Flouros, A., Demertzis, P., y Akrida-Demertzi, K. (2005). Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. *Food Control*, 16 (2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.01.005>
- Bai, L., Smuts, J., Schenk, J., Cochran, J. y Schug, K. (2018). Comparison of GC-VUV, GC-FID, and comprehensive two-dimensional GC-MS for the characterization of weathered and unweathered diesel fuels. *Fuel*, 214, 521-527. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.053>
- Barhdadi, S., Canfyn, M., Courselle, P., Rogiers, V., Vanhaecke, T. y Deconick, E. (2017). Development and validation of a HS/GC-MS method for the simultaneous analysis of diacetyl and acetylpropionyl in electronic cigarette refills. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 142, 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.050>
- BLAUBRAND. (2015). *Aparatos volumétricos y picnómetros. Instrucciones de calibrado (SOP)*, 5-11. Recuperado el 15/08/2018 desde: [https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/SOPs/SOP\\_BLAUBRAND\\_ES.pdf](https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/SOPs/SOP_BLAUBRAND_ES.pdf)
- Bradley, A., Luong, N., Faisal, H., Duu-Jong, L., Van de Merwe, J., Leusch, F...Long, N. (2016). Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity. *International biodeterioration & biodegradation*, 113, 169-176. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.027>
- Comunidad Europea (CE). (1989). Reglamento (CEE) nº 1576/89 del consejo-Indicaciones geográficas (Bebidas espirituosas).
- Coscollà, C., Navarro-Olivares, S., Martí, P. y Yusà, V. (2014). Application of the experimental design of experiments (DoE) for the determination of organotin compounds in water samples using HS-SPME and GC-MS/MS. *Talanta*, 119, 544-552. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.052>
- Currie, L. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure & Applied chemistry*, 67 (10), 1699-1723.
- Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. *Journal of Analytical chemistry*, 40 (3), 586-593. <http://www.doi.org/10.1021/ac60259a007>
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2018). *Encuesta mensual manufacturera*. Recuperado el 10/06/2017 desde: [http://www.dane.gov.co/files/intestigaciones/boletines/mmm/bol\\_emm\\_ene18.pdf](http://www.dane.gov.co/files/intestigaciones/boletines/mmm/bol_emm_ene18.pdf)
- Dragone, G., Mussatto, S., Oliveira, J. y Teixeira, J. (2009). Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112, 929-935. <http://doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.005>
- Drummer, O. (2013). Alcohol congeners and the source of ethanol. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Southbank, Australia: Elsevier Ltd., 318-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.09986-4>
- Dubois, L., Stefanuto, P.-H., Heudt, L., Focant, J.-F. y Perrault, K. (2018). Characterizing decomposition odor from soil and adipocere samples at a death scene using HS-SPME-GCxGC-HRTOFMS. *Forensic chemistry*, 8, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.jforc.2018.01.001>

- Dwyer, J. y Tamama, K. (2013). Ketoacidosis and trace amounts of isopropanol in a chronic alcohol patient. *Clinica Chimica Acta*, 415 (16), 245-249. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2012.10.057>
- Farmacopea de Estados Unidos (USP). (2010). Residual solvents. *Chemical Tests*: 1-37. Recuperado el 20/01/2018 desde: <http://hm.c.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c467.pdf>
- Feng, Y., Cai, Y., Sun-Waterhouse, D., Cui, C., Su, G., Lin, L., Zhao, M. (2015). Approaches of aroma extraction dilution analysis (AEDA) for headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry (HS-SPME-GC-O): Altering sample amount, diluting the sample or adjusting split ratio?. *Food chemistry*, 187, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.138>
- Feron, V., Til, H., De Vrijer, F., Woutersen, R., Cassee, F., y VanBladeren, P. (1991). Aldehydes: Occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation/ Research/Genetic Toxicology*, 259 (3-4), 363-385. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90128-9)
- Geroyiannaki, M., Komaitis, M., Stavarakas, D., Polysiou, M., Athanasopoulos, P. y Spanos, M. (2007). Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 18, 988-995. <http://doi.10.1016/j.foodcont.2006.06.005>
- Gutiérrez, H. y de la Vara, R. (Ed). (2012). *Análisis y diseño de experimentos, tercera edición*. México, D.F.: Editorial McGraw Hill/Iberoamericana Editores p. 71.
- Hernández, J., Recalde, V. y Erazo, A. (2015). Determinación de congéneres en alcohol extra neutro rectificado empleado en la elaboración de bebidas alcohólicas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13 (1), 28-37.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1996). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 222-bebidas alcohólicas. Definiciones generales, tercera actualización*, 1-7.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1996). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 917-bebidas alcohólicas. Whisky, sexta actualización*, 1-4.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1999). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 300-bebidas alcohólicas. Ginebra y ginebra compuesta o gin, cuarta actualización*, 1-4.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1999). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 305-bebidas alcohólicas. Vodka, sexta actualización*, 1-4.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1999). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 410-bebidas alcohólicas. Aguardiente de caña, caña, cachaza o branquiña, sexta actualización*, 1-4.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2001). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 620-bebidas alcohólicas. Alcohol etílico, séptima actualización*, 1-12.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2001). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 620-bebidas alcohólicas. Alcohol etílico, séptima actualización*, 1-12.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2003). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 5159-bebidas alcohólicas. Método colorimétrico para determinar el contenido de metanol*, 1-3.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2003). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 196-bebidas alcohólicas. Métodos para determinar el contenido de ésteres, segunda actualización*, 1-2.

- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2004). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 3442-bebidas alcohólicas. Tafias de caña, primera actualización*, 1-4.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2005). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 269-bebidas alcohólicas. Determinación del contenido de furfural, primera actualización*, 1-5.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2005). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 278-bebidas alcohólicas. Ron, sexta actualización*, 1-5.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2005). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 411-bebidas alcohólicas. Anís o anisado, octava actualización*, 1-5.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2005). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 634-bebidas alcohólicas. Brandy, sexta actualización*, 1-4.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2006). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 242-bebidas alcohólicas. Método para determinar el contenido de aldehídos, tercera actualización*, 1-6.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2007). *Norma Técnica Colombiana (NTC) 5157-bebidas alcohólicas y alcohol etílico. Método para determinar el contenido de alcoholes superiores, primera actualización: 1-5*.
- International Conference of Harmonization (ICH). (1996). *Guideline, Q2 (R1) for validation of analytical procedures: Text and Methodology*, 4-13. Recuperado el 12/09/2017 desde: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (2012). *Compendium of chemical terminology, gold book*: p. 1295. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- Jung, A., Jung H. y Muntean, D. (2013). Gas-chromatographic method for volatile congeners in alcoholic beverages analysis. *Revista de chimie*, 64(7), 688-692.
- Kamatou, G. y Viljoen, A. (2017). Comparison of fatty acid methyl esters of palm and palmist oils determined by GCXGC-ToF-MS and GC-MS/FID. *South African Journal of Botany*, 112, 483-488. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.06.032>
- Karimi, Z., Shamsipur, M., Amouzadeh, M. y Rostamnia, S. (2018). A highly sensitive electrochemical sensor for the determination of methanol based on PdNPs@SBA-15-PrEn modified electrode. *Analytical Biochemistry*, 548, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.033>
- Katselou, M., Athanaselis, S., Nikolaou, P., Dona, A., Spiliopoulou, C. y Papoutsis, I. (2017). Development and validation of a GC-MS method for the determination of hydroxyzine and its active metabolite, cetirizine, in whole blood. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 145, 765-772. <http://www.doi.org/10.1016/j.jpba/2017.07.059>
- Kostik, V., Shaban, M. y Bauer, V. (2013). Gas-chromatographic analysis of some volatile congeners in different types of strong alcoholic fruit spirits. *Journal of hygienic engineering and design*, 4, 98-102.
- Kruis, A., Levisson, M., Mars, A., van der Ploeg, M., Garcés, F., Ellena, V.,... Weusthuis, R. (2017). Ethyl acetate production by the elusive alcohol acetyltransferase from yeast. *Metabolic Engineering*, 41, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.03.004>
- López-Vázquez, C., Bollaín, M., Berstsch, K., Orriols, I. (2010). Fast determination of principal volatile compounds in distilled spirits. *Food Control*, 21, 1436-1441. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.008>
- Madani-Tonekaboni, M., Kamankesh, M. y Mohammadi, A. (2015). Determination of furfural and hydroxymethyl furfural from baby formula using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography and method

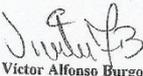
- optimization by response surface methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.004>
- Mani-Varnosfaderani, A., Kanginejad, A. y Yamini, Y. (2018). Exploring the effects of sparsity constrain on the ranges of feasible solutions for resolution of GC-MS data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 173, 30-40. <https://doi.org/10.106/j.chemolab.2017.12.015>
- Medina, Y. (2013). *Evaluación de la concentración de Clostridium acetobutylicum ATCC 824 para la producción de butanol a partir de glucosa* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.
- Milani, M., Rossini, E., Castoldi, K., Pezza, L. y Pezza, H. (2017). Paper platform for reflectometric determination of furfural and hydroxymethylfurfural in sugarcane liquor. *Microchemical Journal*, 133, 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.046>
- Miller, N. y Miller, J. (Ed). (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica, 4 edición*. Madrid, España: Pearson educación S.A. p.15, 43-75, 120-127.
- Mokhtari, B. y Pourabdollah, K. (2011). SPME–GC determination of methanol as a hydrate inhibitor in crude oil. *Talanta*, 87, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.09.050>
- Monteiro, C., Proença, P., Tavares, C., Castañera, A. y Corte, F. (2016). Interference of anesthetics in blood alcohol analysis by HS-GC-FID: A case report. *Forensic Science International*, 265, 65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.010>
- Moriarty, P., Hodgson, E., Froehlich, H., Hennessey, S., Marshall, K., Oken, K...Stawitz, C. (2018). The need for validation of ecological indices. *Ecological indicators*, 84, 546-552. <http://www.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.028>
- Organismo Nacional de Acreditación en Colombia (ONAC). (2013). *Ensayos de aptitud*. Recuperadp de: <http://www.onac.org.co/modulos/contenido/default.asp?idmodulo=601>
- Oro, L. Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G. y Comitin, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 265, 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.027>
- Patakova, P., Kolek, J., Sedlar, K., Koscova, P., Branska, B., Kupkova, K., Paulova, L. y Provaznikb, I. (2017). Comparative analysis of high butanol tolerance and production in clostridia. *Biotechnology Advances*, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.004>
- Quintans, L., Maciel, M., Castro, J. y Castro, G. (2013). Acumulación de acetaldehído y estrés oxidativo en testículo luego de la intoxicación alcohólica en ratas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47 (4), 709-718.
- Rodríguez-Valencia, N. y Zambrano-Franco, A. (2011). Producción de alcohol a partir de mucílago de café. *Revista cenicafé*, 62 (1), 56-69.
- Rohsenow, D., Howland, J., Arnedt, T., Almeida, A., Greece, J., Minsky, S., Kempler, C. y Sales, S. (2010). Intoxication With Bourbon Versus Vodka: Effects on Hangover, Sleep, and Next-Day Neurocognitive Performance in Young Adults. *Alcoholism Clinical y Experimental Research*, 34 (3), 509-518. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01116.x>
- Sang-Hyun, L., Sooah, K., Jung, Y., Nam, Y. y Kyoung, H. (2016). Enhanced butanol fermentation using metabolically engineered *Clostridium acetobutylicum* with ex situ recovery of butanol. *Bioresource Technology*, 218, 909-917. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.060>

- Schaper, A. y Ebbecke, M. (2017). Intox, detox, antidotes – Evidence based diagnosis and treatment of acute intoxications. *European Journal of Internal Medicine*, 45, 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.019>
- Shishov, A., Penkova, A., Zabrodin, A., Nikolaev, K., Dmitrenko, M., Ermakov, S. y Bulatov, A. (2016). Vapor permeation-stepwise injection simultaneous determination of methanol and ethanol in biodiesel with voltammetric detection. *Talanta*, 148, 666-672. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.041>
- Soufleros, E., Mygdalia, A. y Natskoulis, P. (2004). Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate “Mouro” by flavor compounds and mineral analysis. *Food Chemistry*, 86 (4), 625-636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.11.006>
- Spaak, G., Nelson, R., Reddy, C., Scarlett, A., Chidlow, G. y Grice, K. (2016). Advances on the separation of crocetane and phytane using GC–MS and GC×GC–TOFMS. *Organic Geochemistry*, 98, 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.05.014>
- Tabacal Agroindustria. (2018). *Elaboración del alcohol etílico*. Recuperado el 15/02/2018 de: [https://www.tabacal.com.ar/files/ELABORACION\\_ALCOHOL.pdf](https://www.tabacal.com.ar/files/ELABORACION_ALCOHOL.pdf)
- Téllez, J. y Cote, M. (2006). Alcohol etílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *Revista Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*, 54 (1), 32-45.
- Tian, J. y Rustum, A. (2016). Development and validation of a fast static headspace GC method for determination of residual solvents in permethrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 408-415. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.020>
- Tomassetti, M., Angeloneli, R., Merola, G., Castrucci, M. y Campanella, L. (2016). Catalytic fuel cell used as an analytical tool for methanol and ethanol determination. Application to ethanol determination in alcoholic beverages. *Electrochimica Acta*, 191, 1001-1009. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.12.171>
- Toxicology Data Network (TOXNET). (2015). *Methyl acetate*. Recuperado el 15/02/2018 de: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+95>
- U.S. Department of Health and Human Services- Food and Drug Administration (FDA). (2001). Guidance for industry, bioanalytical method validation. Recuperado el 13/07/2017 desde: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance/ucm368107.pdf>
- Valcárcel, M. y Gómez, A. (Ed.). (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona, España: Editorial Reverté, p.345-346.
- van Drunen, J., Wilhelmin, T., Kokohb, B. y Jerkiewicz, G. (2014). Electrochemical oxidation of isopropanol using a nickel foam electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 716, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.08.003>
- Veríssimo, M., Gamelas, J., Simões, M., Evtuguin, D. y Gomes, M. (2016). Quantifying acetaldehyde in cider using a Mn(III)-substituted polyoxotungstate coated acoustic wave sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 2608-2613. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.068>
- Vermorel, N., San-Valero, P., Izquierdo, M., Gabaldóna, C. y Peña-roja, J. (2017). Anaerobic degradation of 2-propanol: Laboratory and pilot-scale studies. *Chemical Engineering Science*, 172, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.06.021>
- Zachut, M., Shapiro, F. y Silanikove, N. (2016). Detecting ethanol and acetaldehyde by simple and ultrasensitive fluorimetric methods in compound foods. *Food Chemistry*, 201, 270-274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.079>
- Zhang, H., Wang, Z. y Liu, O. (2015). Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of pharmaceutical analysis*, 5 (4), 223-230. <http://www.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005>

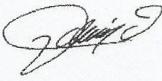


## Anexo 1

## 1. 1 Certificado de calibración de la balanza analítica

Certificado de Calibración	
 <b>ONAC</b> <small>ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005 12-LAC-048</small>	
<b>Calibration Certificate</b>	
Número: 30560 C Number	
<b>LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA</b> Detecto de Colombia Ltda. Metrology Lab. <b>ÁREA DE MASA</b> Mass Area	
<b>INSTRUMENTO</b> <i>Instrument</i>	<b>BALANZA ANALÍTICA</b>
<b>FABRICANTE</b> <i>Manufacturer</i>	<b>OHAUS</b>
<b>MÓDELO</b> <i>Model</i>	<b>AR2140</b>
<b>NÚMERO DE SERIE</b> <i>Serial Number</i>	<b>N0158329050177 P</b>
<b>RANGO DE CALIBRACIÓN</b> <i>Calibration Range</i>	<b>0,01 g a 210 g</b>
<b>SOLICITANTE</b> <i>Customer</i>	<b>INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA</b>
<b>DIRECCIÓN DEL SOLICITANTE</b> <i>Customer address</i>	<b>CALLE 4ª N° 1E- 40 POPAYÁN</b>
<b>FECHA RECEPCIÓN INSTRUMENTO</b> <i>Instrument reception date</i>	<b>2016-05-19</b>
<b>FECHA DE CALIBRACIÓN</b> <i>Calibration date</i>	<b>2016-05-19</b>
<b>NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS</b> <i>Number of pages of this certificate and documents attached</i>	<b>Seis (6)</b>
<b>FIRMA(S) AUTORIZADA(S)</b> <i>Authorized signature (s)</i>	
 <b>Rubén Darío Basante</b> Calibrado por - Calibrated by:	 <b>Víctor Alfonso Burgos</b> Revisado por - Checked by:
<p>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.</p> <p><i>This certificate is an accurate report of the performed measurements. This certificate may not be totally or partially reproduced, except with the written permission of the issuing laboratory.</i></p> <p>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.</p> <p><i>The results of this certificate refer to the time and conditions when the measurements were made. The issuing laboratory assumes no responsibility for damages resulting from improper use of the calibrated instruments.</i></p> <p>Bogotá D.C. Calle 91 No. 49 A-24 B/ La Castellana PBX: 634 8182 Fax: 634 8173 E-mail: bogota@detectodecolombia.com          Cali Calle 5B4 No. 38-75 B/ San Fernando - PBX: 558 6060 Fax: 558 6161 E-mail: cali@detectodecolombia.com          Medellín Calle 60 Sur No. 44-51 Sabaneta - Antioquia PBX: 444 1490 E-mail: medellin@detectodecolombia.com</p> <p style="text-align: center;"><a href="http://www.detectodecolombia.com">www.detectodecolombia.com</a></p>	

## 1. 2 Certificado de calibración de termómetro digital

 Universidad del Valle	<b>LABORATORIO DE METROLOGÍA UNIVERSIDAD DEL VALLE- METROCALIDAD ÁREA DE TERMOMETRIA</b>	 Corporación MetroCalidad
<b>CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN</b> Certificate of Calibration		
		<b>NÚMERO: T0812</b> Number
<b>INSTRUMENTO:</b> <i>Apparatus</i>	TERMOMETRO DIGITAL	Este certificado de calibración documenta la trazabilidad al sistema internacional de unidades (SI) a través de patrones nacionales y/o internacionales reconocidos, custodiados por INM's; ID's y/o laboratorios acreditados reconocidos. El usuario está obligado a recalibrar el instrumento a intervalos apropiados.
<b>FABRICANTE:</b> <i>Manufacturer</i>	CONTROL COMPANY	
<b>MODELO:</b> <i>Model</i>	4052	<i>This calibration certificate documents the international system units traceability according to national standards and/or recognized international standards, in custody by INM's; ID's accredited and recognized laboratories. The user is obligated to recalibrate the instrument in the proper interval.</i>
<b>NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN:</b> <i>Identification number</i>	11225-1-1	
<b>NÚMERO DE SERIE:</b> <i>Serial Number</i>	160561237	La incertidumbre expandida (U) reportada en el presente documento, se ha estimado al combinar las incertidumbres estándar debidas al Patrón ó MRC, Método e Instrumento a evaluar, por un factor (k) que permite tener un nivel de confianza aproximado al 95%. (U y k) se reportan en los anexos del presente documento para cada tipo de calibración específica.
<b>SOLICITANTE:</b> <i>Customer</i>	INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA	
<b>DIRECCIÓN:</b> <i>Address</i>	Calle 4 No. 1E-40 Popayan	Este certificado no puede ser reproducido parcialmente, excepto con autorización del laboratorio que lo emite.
<b>FECHA DE CALIBRACIÓN</b> <i>Calibration date</i>	2016-12-06	Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas, dichos resultados se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones; el laboratorio de calibraciones no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado del presente documento y de los instrumentos calibrados
		El instrumento es provisto de una estampilla que contiene la identificación del laboratorio, el número del certificado y la fecha de calibración.
<b>NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: 3</b> <i>Number of pages of this certificated with attachments</i>		
<b>FIRMAS AUTORIZADAS</b> <i>Authorized signatures</i>		
<b>Sello - Seal</b>  FOR-TC-010	 <b>Tecn. Juan Carlos Diaz</b> Cargo: Técnico <i>Calibrado por - Calibrated by</i> <b>Fecha de Recepción: 2016-12-02</b> <i>Date of Reception</i>	 <b>Ing. Libardo Antonio Muñoz Daza</b> Cargo: Director Ejecutivo <i>Revisado por - Checked by</i> <b>Fecha de expedición: 2016-12-06</b> <i>Date of Issue</i>

## 1. 3 Certificado de calibración de micropipeta 20-200 µL

 Universidad del Valle	<b>LABORATORIO DE METROLOGIA UNIVERSIDAD DEL VALLE- METROCALIDAD ÁREA DE VOLUMEN</b>	 Corporación MetroCalidad
<b>CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN</b> Certificate of Calibration		
		<b>NÚMERO: V 0676</b> Number
<b>INSTRUMENTO:</b> <i>Apparatus</i>	MICROPIPETA	Este certificado de calibración documenta la trazabilidad al sistema internacional de unidades (SI) a través de patrones nacionales y/o internacionales reconocidos, custodiados por INM's; ID's y/o laboratorios acreditados reconocidos. El usuario esta obligado a recalibrar el instrumento a intervalos apropiados.  <i>This calibration certificate documents the international system units traceability according to national standards and/or recognized international standards, in custody by INM's; ID's accredited and recognized laboratories. The user is obligated to recalibrate the instrument in the proper interval.</i>
<b>FABRICANTE:</b> <i>Manufacturer</i>	BRAND	
<b>MODELO:</b> <i>Model</i>	TIPO A	
<b>NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN:</b> <i>Identification number</i>	04629	
<b>NÚMERO DE SERIE:</b> <i>Serial Number</i>	07L53242	
<b>SOLICITANTE:</b> <i>Customer</i>	INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA	La incertidumbre expandida (U) reportada en el presente documento, se ha estimado al combinar las incertidumbres estándar debidas al Patrón ó MRC, Método e Instrumento a evaluar, por un factor (k) que permite tener un nivel de confianza aproximado al 95%. (U y k) se reportan en los anexos del presente documento para cada tipo de calibración específica.  Este certificado no puede ser reproducido parcialmente, excepto con autorización del laboratorio que lo emite.  Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas, dichos resultados se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones; el laboratorio de calibraciones no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado del presente documento y de los instrumentos calibrados  El instrumento es provisto de una estampilla que contiene la identificación del laboratorio, el número del certificado y la fecha de calibración.
<b>DIRECCIÓN:</b> <i>Address</i>	Calle 4 No. 1E-40 Popayan	
<b>FECHA DE CALIBRACIÓN:</b> <i>Calibration date</i>	2016-11-10	
<b>NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: 3</b> <i>Number of pages of this certificated with attachments</i>		
<b>FIRMAS AUTORIZADAS</b> <i>Authorized signatures</i>		
Sello - Seal  FOR-TC-010	 <b>Tec. Julian Camilo Charry</b> Cargo: Técnico <i>Calibrado por - Calibrated by</i> <b>Fecha de Recepción: 2016-11-03</b> <i>Date of Reception</i>	 <b>Ing. Libardo Antonio Muñoz Daza</b> Cargo: Director Ejecutivo <i>Revisado por - Checked by</i> <b>Fecha de expedición: 2016-11-10</b> <i>Date of Issue</i>

## 1. 4 Certificado de calibración de micropipeta 100-1000 µL

 Universidad del Valle	<b>LABORATORIO DE METROLOGIA UNIVERSIDAD DEL VALLE- METROCALIDAD ÁREA DE VOLUMEN</b>	 Corporación Metrocalidad
<b>CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN</b> Certificate of Calibration		
		<b>NÚMERO: V 0677</b> Number
<b>INSTRUMENTO:</b> <i>Apparatus</i>	MICROPIPETA	Este certificado de calibración documenta la trazabilidad al sistema internacional de unidades (SI) a través de patrones nacionales y/o internacionales reconocidos, custodiados por INM's; ID's y/o laboratorios acreditados reconocidos. El usuario esta obligado a recalibrar el instrumento a intervalos apropiados.
<b>FABRICANTE:</b> <i>Manufacturer</i>	BRAND	
<b>MODELO:</b> <i>Model</i>	TIPO A	<i>This calibration certificate documents the international system units traceability according to national standards and/or recognized international standars, in custody by INM's; ID's accredited and recognized laboratories. The user is obligated to recalibrate the instrument in the proper interval.</i>
<b>NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN:</b> <i>Identification number</i>	04731	
<b>NÚMERO DE SERIE:</b> <i>Serial Number</i>	10M83251	La incertidumbre expandida (U) reportada en el presente documento, se ha estimado al combinar las incertidumbres estándar debidas al Patrón ó MRC, Método e Instrumento a evaluar, por un factor (k) que permite tener un nivel de confianza aproximado al 95%. (U y k) se reportan en los anexos del presente documento para cada tipo de calibración específica.
<b>SOLICITANTE:</b> <i>Customer</i>	INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA	Este certificado no puede ser reproducido parcialmente, excepto con autorización del laboratorio que lo emite.
<b>DIRECCIÓN:</b> <i>Address</i>	Calle 4 No. 1E-40 Popayan	
<b>FECHA DE CALIBRACIÓN</b> <i>Calibration date</i>	2016-11-11	Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas, dichos resultados se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones; el laboratorio de calibraciones no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado del presente documento y de los instrumentos calibrados
El instrumento es provisto de una estampilla que contiene la identificación del laboratorio, el número del certificado y la fecha de calibración.		
<b>NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: 3</b> <i>Number of pages of this certificated with attachments</i>		
<b>FIRMAS AUTORIZADAS</b> <i>Authorized signatures</i>		
 Sello - Seal		
FOR-TC-010	<b>Tec. Julian Camilo Charry</b> Cargo: Técnico <i>Calibrado por - Calibrated by</i> <b>Fecha de Recepción: 2016-11-03</b> <i>Date of Reception</i>	<b>Ing. Libardo Antonio Muñoz Daza</b> Cargo: Director Ejecutivo <i>Revisado por - Checked by</i> <b>Fecha de expedición: 2016-11-11</b> <i>Date of Issue</i>

# 1.5 Certificado de calibración de cromatógrafo de gases AGILENT 7890B

PROCESO: SOPORTE  
 CÓDIGO: FK-P3-01  
 VERSIÓN: 03-12 De Mayo de 2015



## INFORME DE SERVICIO Y/O ACTA DE RECIBO A SATISFACCIÓN

Ciudad y Fecha: POPAYÁN - Friday, December 02, 2016      Inicio servicio: 01/12/2016 8:00 a.m.  
 Código del Informe: KH4788      Fin servicio: 02/12/2016 5:30 p.m.  
 Compañía: INDUSTRIA LICORERA DEL CAUCA      Dirección: CALLE 4 # 1E - 40  
 Persona encargada: CAROLINA SOLANO  
 Usuario: CAROLINA SOLANO  
 Motivo de la Visita: Mantenimiento       Instalación       Calificación OQ/PV   
    Entrenamiento       Soporte       Diagnostico   
    Mantenimiento Correctivo       Soporte Remoto       Acta de Entrega   
 Equipo: 7890A GC      Serial: US13293006  
 Agilent Technologies - GC

### Configuración

Items	Nombre Componente	Configuración	Módulo	Serial	Versión
1	ALS	G4513A	N/A	CN13280103	N/A
2	DETECTOR BACK	N/A	N/A	N/A	N/A
3	DETECTOR FRONT	FID	N/A	N/A	N/A
4	HEAD SPACE	G4556-64000	N/A	CN1328003	N/A
5	INYECTOR BACK	N/A	N/A	N/A	N/A
6	INYECTOR F	SPLIT-SPLITLESS	N/A	N/A	N/A
7	SOFTWARE	OpenLAB CDS ChemStation	N/A	B8CA3AAA5394.LIC	C.01.05
8	SOFTWARE CONTROL HS	N/A	N/A	KGBJ6-222JG-R389T-LW22Q	B.01.03

### Detalles de la Revisión

Diagnóstico: El equipo se encuentra en condiciones operativas normales.  
 El software presenta problemas de conexión; se verifican conexiones y se encuentra problemas de encendido del switch.  
 El mesón donde está el equipo se encuentra con un leve hundimiento en la mitad.  
 Además de que no se controlan las condiciones ambientales y el sitio en el que está el equipo permite el acceso de mucho polvo que a futuro puede generar problemas electrónicos.

Carrera 18 No. 82 - 23      Bogotá, D.C. Colombia      PBX: 571 - 691 3111      Fax: 571 - 617 0403      www.khymos.com  
 info@khymos.com



**Agilent Technologies**

Authorized Distributor

## Anexo 2

**Tabla 1.** Resultados de la Calibración de los 35 balones aforados utilizados en la validación

#	Denominación	V <sub>20</sub> (mL)	s	Prueba 1/3
1		9,96540	0,00953	
2		10,03577	0,01244	
3		10,02315	0,00746	
4		9,97141	0,00812	
5		9,99795	0,00513	
6		9,96419	0,01281	0,01333
7		10,03137	0,01026	
8		9,99026	0,00825	
9		10,01438	0,00992	
10	10 mL	10,02938	0,01117	
11		9,97383	0,00344	
12		9,97639	0,00804	
13		9,98972	0,00766	
14		9,97661	0,00682	
15		9,98295	0,00539	
16		9,98988	0,00478	0,00833
17		9,97436	0,00803	
18		9,97898	0,00791	
19		9,99093	0,00483	
20		10,00657	0,00396	
21	25 mL	25,02320	0,01235	
22		25,00621	0,00834	
23		24,99911	0,00933	0,01333
24		24,98504	0,01224	
25		25,01897	0,00860	
26		49,96813	0,01703	
27	50 mL	49,98037	0,01859	
28		50,05744	0,01943	0,02
29		50,03892	0,00904	
30		50,03176	0,01565	
31	100 mL	9,98776	0,03123	
32		100,02748	0,03057	0,03333
33		99,92104	0,02664	
34	250 mL	250,08126	0,04769	0,05
35	1000 mL	1000,38815	0,1285	0,13333

### Anexo 3

**Tabla 1.** Respuestas obtenidas para cada uno de los experimentos del diseño

# Experimento	Flujo (mL/min)	Rampa (°C)	Resolución	Tiempo
1	0,9379	7,0000	116,39	18,394
2	1,0000	4,0000	143,44	22,934
3	1,1500	11,2426	115,43	14,753
4	1,1500	2,7574	130,45	25,973
5	1,1500	7,0000	117,87	17,642
6	1,1500	7,0000	116,65	17,639
7	1,3621	7,0000	119,99	17,063
8	1,0000	10,0000	111,99	15,795
5	1,1500	7,0000	116,80	17,637
10	1,3000	4,0000	133,45	21,560
11	1,3000	10,0000	133,01	15,065

## Anexo 4

**Tabla 1.** Promedio de relación de áreas obtenido para cada nivel y analito en la repetibilidad

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,04156	0,07688	0,13475	0,22914	0,35647	0,47495	0,65064
Metanol	0,27844	0,53547	1,04862	1,81959	2,76815	3,83964	5,29877
i-propanol	0,10734	0,17736	0,31828	0,54025	0,80690	1,09996	1,49977
Metilacetato	0,07380	0,14570	0,28433	0,48463	0,76204	1,05453	1,42936
n-propanol	0,07465	0,17047	0,32104	0,57995	0,89174	1,24691	1,71245
Etilacetato	0,09399	0,17765	0,34501	0,61417	0,94718	1,32090	1,77055
s-butanol	0,07737	0,16318	0,31225	0,57271	0,87848	1,24784	1,71224
i-butanol	0,09400	0,18639	0,38104	0,67274	1,03258	1,43440	1,99067
n-butanol	0,09230	0,22752	0,47015	0,86890	1,36928	1,93610	2,65954
3-metilbutanol	0,07850	0,16245	0,33958	0,63424	0,97677	1,38793	1,94014
2-metilbutanol	0,12117	0,21901	0,41633	0,74076	1,13227	1,55742	2,11652
Furfural	0,11412	0,26273	0,50669	0,96217	1,48054	2,13382	2,89842

**Tabla 2.** Desviación estándar para cada nivel y analito en la repetibilidad

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,00270	0,00339	0,00759	0,00878	0,01316	0,01030	0,01267
Metanol	0,01345	0,00763	0,02031	0,02086	0,06075	0,02403	0,06281
i-propanol	0,00452	0,00402	0,00532	0,00902	0,01106	0,02809	0,03001
Metilacetato	0,00138	0,00320	0,00696	0,00789	0,01674	0,02166	0,03954
n-propanol	0,01545	0,01686	0,01852	0,01235	0,02071	0,02223	0,01651
Etilacetato	0,01042	0,00811	0,00544	0,01536	0,02438	0,02899	0,05556
s-butanol	0,01027	0,00934	0,01090	0,00559	0,02245	0,02772	0,01430
i-butanol	0,01129	0,01106	0,00964	0,02156	0,02544	0,01384	0,02909
n-butanol	0,00529	0,01940	0,02358	0,03277	0,06272	0,04776	0,06190
3-metilbutanol	0,00340	0,00350	0,00894	0,01297	0,01977	0,00613	0,01138
2-metilbutanol	0,01106	0,01637	0,01740	0,03242	0,04097	0,02561	0,03895
Furfural	0,01375	0,04907	0,03059	0,01585	0,02178	0,05344	0,04688

## Anexo 5

**Tabla 1.** Promedio de relación de áreas obtenido para cada nivel y analito en la precisión intermedia

Analito	Nivel						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,04640	0,07239	0,13577	0,24024	0,36096	0,45494	0,64195
Metanol	0,27921	0,53031	1,01471	1,87017	2,81461	3,80272	5,13435
i-propanol	0,10280	0,16986	0,30428	0,54060	0,82347	1,08314	1,45043
Metilacetato	0,07491	0,14573	0,27631	0,51793	0,79223	1,00366	1,44826
n-propanol	0,08313	0,17687	0,32784	0,61182	0,94792	1,24644	1,69596
Etilacetato	0,10068	0,18984	0,36117	0,66921	1,01632	1,29940	1,85562
s-butanol	0,09114	0,17194	0,33239	0,60741	0,94972	1,24836	1,68667
i-butanol	0,09730	0,19992	0,38269	0,70790	1,11720	1,46849	1,94893
n-butanol	0,12064	0,24243	0,47514	0,91205	1,45971	1,95412	2,62837
3-metilbutanol	0,08294	0,17260	0,34429	0,66044	1,00658	1,40185	1,89534
2-metilbutanol	0,10685	0,21374	0,40790	0,75733	1,12637	1,55397	2,06084
Furfural	0,14166	0,27096	0,53101	1,02662	1,55520	2,15583	2,92002

**Tabla 2.** Desviación estándar para cada nivel y analito en la precisión intermedia

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,00544	0,00115	0,00668	0,00769	0,01858	0,01009	0,01035
Metanol	0,01079	0,01657	0,01415	0,05381	0,09061	0,05709	0,05299
i-propanol	0,00389	0,00604	0,00436	0,01375	0,04204	0,01201	0,02579
Metilacetato	0,00512	0,00514	0,00857	0,01019	0,04225	0,03786	0,01969
n-propanol	0,00858	0,00881	0,01430	0,02557	0,05210	0,02308	0,02670
Etilacetato	0,00565	0,00703	0,01331	0,02442	0,06203	0,05666	0,04719
s-butanol	0,01359	0,01008	0,01737	0,01739	0,05431	0,01706	0,03339
i-butanol	0,00936	0,02096	0,02085	0,02889	0,08043	0,01528	0,03824
n-butanol	0,01219	0,01380	0,02089	0,03235	0,08196	0,01929	0,04326
3-metilbutanol	0,00428	0,00664	0,01240	0,01501	0,01293	0,01519	0,03623
2-metilbutanol	0,00788	0,00994	0,01839	0,01624	0,01916	0,01695	0,04928
Furfural	0,01662	0,01126	0,01416	0,04358	0,02439	0,02804	0,05205

## Anexo 6

**Tabla 1.** Promedio y desviación estándar de las pendientes obtenidos para cada día y analito en la reproducibilidad

Analito	Día									
	1		4		8		15		30	
	Media	s								
Acetaldehído	0,31598	0,00394	0,31956	0,00435	0,31123	0,00540	0,31571	0,00141	0,31460	0,00136
Metanol	0,52074	0,00729	0,52949	0,00534	0,53250	0,01131	0,52636	0,00345	0,52222	0,00399
i-propanol	0,72648	0,00819	0,73648	0,00983	0,73822	0,01370	0,72887	0,00066	0,73288	0,00258
Metilacetato	0,35191	0,00729	0,34862	0,00332	0,34325	0,00938	0,35560	0,01144	0,35130	0,00963
n-propanol	0,84984	0,01032	0,86309	0,00969	0,86355	0,01594	0,85762	0,00217	0,86119	0,00891
Etilacetato	0,43941	0,01208	0,43577	0,00638	0,42805	0,01175	0,42865	0,00119	0,42343	0,01291
s-butanol	0,84678	0,00770	0,85638	0,00852	0,86498	0,01307	0,84981	0,00049	0,85590	0,00027
i-butanol	0,98955	0,00581	0,99191	0,01259	0,99361	0,01427	0,98987	0,00891	0,98093	0,00482
n-butanol	0,89124	0,01021	0,90849	0,00594	0,91516	0,01708	0,89796	0,00379	0,90499	0,00870
3-metilbutanol	0,96570	0,01042	0,97973	0,01505	0,98756	0,01694	0,97764	0,00367	0,97284	0,00692
2-metilbutanol	1,04097	0,00975	1,05325	0,01335	1,05649	0,02076	1,04731	0,01738	1,05797	0,02197
Furfural	0,72857	0,00823	0,74007	0,01023	0,74964	0,01599	0,74761	0,00454	0,74444	0,00514

## Anexo 7

**Tabla 1.** %Error obtenido para cinco niveles de concentración en la determinación de la exactitud

Analito	Nivel de concentración				
	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Muy alto diluido
Acetaldehído	-7,48067	0,33443	3,42790	-1,97569	-1,31713
Metanol	0,73075	3,19372	3,84845	0,52598	0,46109
i-propanol	-7,33053	4,29060	4,91561	-0,15232	0,67478
Metilacetato	-2,22687	5,71725	5,13796	1,76122	7,03566
n-propanol	-11,57413	4,43902	3,32885	-1,46509	2,44465
Etilacetato	2,34880	5,37542	3,70183	0,65549	9,19002
s-butanol	-6,12147	4,08535	4,04650	-1,73024	2,36255
i-butanol	-10,30853	3,97185	4,79775	-2,03184	1,47363
n-butanol	-6,49147	6,66288	4,26765	-2,15242	3,61310
3-metilbutanol	-17,02613	4,76245	4,40834	-2,19359	2,90842
2-metilbutanol	6,75253	4,62882	3,53319	0,57921	3,82395
Furfural	-11,06660	3,62017	2,31576	-1,55836	0,65367

## Anexo 8

**Tabla 1.** Significancia obtenida para la prueba de Levene en la determinación de la robustez

Analito	Nivel de concentración						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	0,129	0,076	0,442	0,610	0,068	0,217	0,820
Metanol	0,155	0,146	0,219	0,205	0,233	0,052	0,342
i-propanol	0,176	0,568	0,026	0,288	0,337	0,105	0,178
Metilacetato	0,901	0,207	0,576	0,156	0,683	0,341	0,116
n-propanol	0,427	0,103	0,588	0,046	0,385	0,065	0,180
Etilacetato	0,309	0,514	0,071	0,584	0,565	0,228	0,134
s-butanol	0,736	0,029	0,395	0,227	0,606	0,327	0,371
i-butanol	0,867	0,897	0,222	0,043	0,481	0,224	0,073
n-butanol	0,694	0,343	0,642	0,129	0,767	0,102	0,563
3-metilbutanol	0,261	0,101	0,078	0,312	0,214	0,060	0,668
2-metilbutanol	0,901	0,186	0,378	0,384	0,572	0,385	0,265
Furfural	0,130	0,215	0,196	0,117	0,098	0,073	0,588

**Tabla 2.** Desviación estándar obtenida por cada analista para cada nivel y analito en la robustez

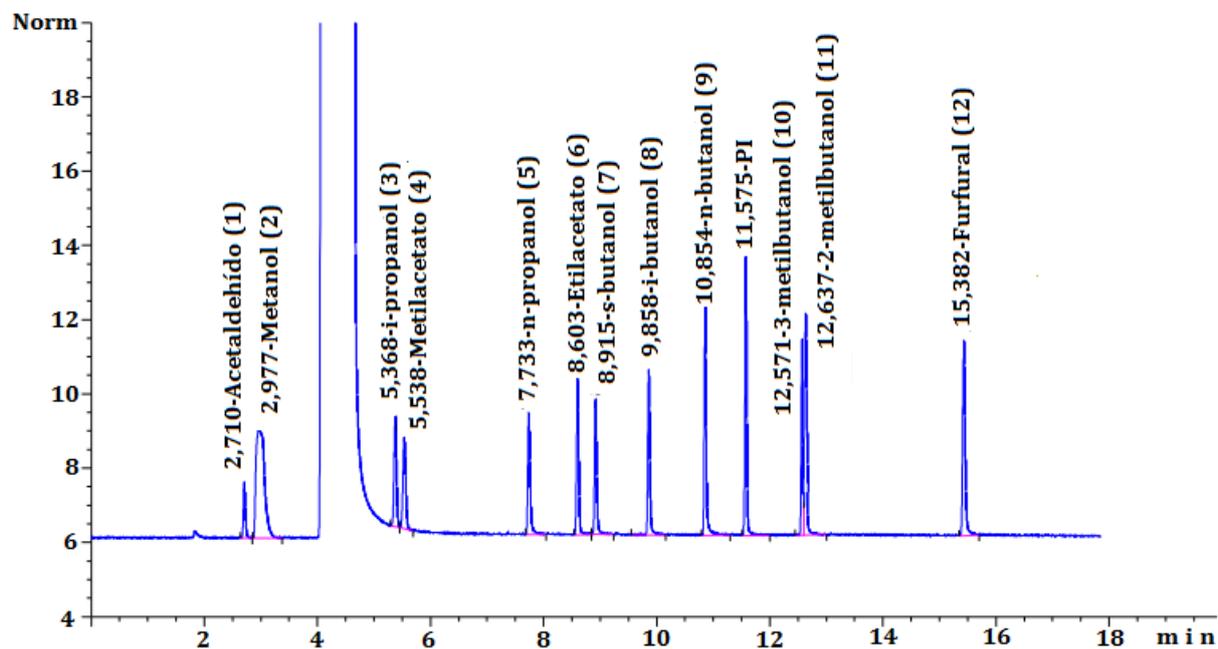
Analito	Analista	Nivel de concentración						
		1	2	3	4	5	6	7
Acetaldehído	1	0,00670	0,00146	0,00273	0,00610	0,01083	0,00489	0,00976
	2	0,00266	0,00464	0,00486	0,00440	0,29900	0,01228	0,00875
Metanol	1	0,00156	0,01407	0,02343	0,05784	0,09035	0,02797	0,04207
	2	0,00346	0,03856	0,01323	0,02730	0,04488	0,11857	0,02758
i-propanol	1	0,00267	0,00572	0,01223	0,01478	0,02144	0,01372	0,01129
	2	0,01010	0,18057	0,00162	0,00726	0,00928	0,03267	0,02296
Metilacetato	1	0,00223	0,00170	0,00691	0,01414	0,01575	0,01771	0,00943
	2	0,00224	0,00308	0,00860	0,00660	0,01730	0,01190	0,02292
n-propanol	1	0,00964	0,00437	0,01451	0,02261	0,01512	0,01910	0,02860
	2	0,01469	0,02323	0,01018	0,00322	0,00880	0,05976	0,01267
Etilacetato	1	0,00653	0,00833	0,01345	0,01507	0,01989	0,01600	0,01471
	2	0,01261	0,01338	0,00206	0,01941	0,01459	0,00739	0,03161
s-butanol	1	0,01551	0,00136	0,00653	0,01863	0,03187	0,02175	0,02770
	2	0,01362	0,01531	0,01361	0,00455	0,02175	0,03729	0,01425
i-butanol	1	0,00557	0,01281	0,00819	0,03866	0,03451	0,03244	0,01641
	2	0,00515	0,01246	0,01474	0,00136	0,02356	0,05783	0,58185
n-butanol	1	0,01937	0,03289	0,01763	0,01152	0,03126	0,02849	0,02358
	2	0,02154	0,01635	0,01211	0,03168	0,03828	0,00945	0,02950
3-metilbutanol	1	0,00324	0,00272	0,00239	0,02094	0,02942	0,01625	0,01642
	2	0,00620	0,00709	0,01197	0,01050	0,05237	0,05208	0,01379
2-metilbutanol	1	0,01076	0,00867	0,01146	0,03984	0,02948	0,01409	0,03042
	2	0,01204	0,01975	0,00726	0,02236	0,01832	0,02362	0,04985
Furfural	1	0,01532	0,01771	0,02105	0,03348	0,05398	0,03394	0,03232
	2	0,00506	0,04201	0,00960	0,00984	0,00537	0,10174	0,04058

## Anexo 9

**Tabla 1.** Concentración experimental media obtenida para medir la aptitud frente a tres muestras externas al laboratorio donde se validó la metodología

Analito	Nivel Bajo		Nivel Medio		Nivel Alto	
	C <sub>0</sub>	C exp.	C <sub>0</sub>	C exp.	C <sub>0</sub>	C exp.
Acetaldehído	10	10,12266	20	20,37949	40	42,08112
Metanol	10	9,32653	20	20,10176	40	41,28514
i-propanol	10	10,27718	20	19,59809	40	39,83093
n-propanol	150	151,08044	250	247,38689	350	354,37830
Etilacetato	150	144,90613	250	245,58604	350	356,10169
s-butanol	10	9,87619	20	19,93323	40	40,96658
i-butanol	150	151,35490	250	247,76630	350	354,40765
n-butanol	10	10,30490	20	19,97081	40	40,82024
3-metilbutanol	150	169,30509	250	252,97118	350	350,35038
2-metilbutanol	150	138,74557	250	242,62282	350	356,78582
Furfural	10	10,03148	20	19,92990	40	40,83156

## Anexo 10



Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de análisis:

Columna: DB-624 UI

Programación en el horno de la columna: 35°C (5 minutos) a 10,96 °C/min hasta 110°C (5 minutos)

Flujo de gas portador: 1,36 mL/min de helio

Modo de inyección: Automuestreador ALS AGILENT G4513A *Split* 10:1

Temperatura de inyección: 160°C

Temperatura de detección: 230°C

Patrón interno: 3-pentanol