

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS VOLÁTILES PRODUCIDOS EN EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA POR EL MÉTODO DE
CROMATOGRAFÍA DE GASES-FID

ANGELA MARIA CORREA OTERO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS VOLÁTILES PRODUCIDOS EN EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA POR EL MÉTODO DE
CROMATOGRAFÍA DE GASES-FID

ÁNGELA MARÍA CORREA OTERO

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

DIRECTOR

EDIER HUMBERTO PÉREZ, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación
Universidad del Cauca

CODIRECTORA

FABIOLA LEGARDA, Ing. Química

Directora Destilería Ingenio Mayagüez S.A

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011

Nota de Aceptación

APROBADO

Director _____
Edier Humberto Pérez. Dr

Jurado _____
Liliana Montalvo. Msc

Jurado _____
René Zuñiga

Fecha de sustentación: 28 de enero de 2011

*Este trabajo se lo dedico a Dios y a mis Padres por ser mis guías e inspiradores
Durante toda mi vida, por darme el amor y apoyo incondicional necesario para alcanzar el
Éxito y llevar a feliz término mí meta*

A mis hermanas por su compañía, amor, confidencialidad y palabras de apoyo siempre

Este triunfo es para ustedes

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser el motor para emprender y culminar con éxito esta etapa de mi vida, sin ellos no hubiese podido hacer realidad este logro tan importante

A mi Director de tesis, Edier H. Pérez por su orientación, paciencia y tiempo dedicado a este trabajo

A la codirectora de mi trabajo, Ingeniera Fabiola Legarda por darme la oportunidad de realizar mi pasantía en la Destilería del Ingenio Mayagüez, por la colaboración y apoyo prestados durante todo ese tiempo

Al profesor Edwin Rengifo por su asesoría, ayuda y dedicación en la parte estadística de mi trabajo de grado

Al Ingenio Mayagüez por apoyarme económicamente en el desarrollo del presente trabajo

A los Jurados por la dedicación y tiempo empleado en la revisión de este documento

A los profesores del departamento de Química por participar en mi formación profesional, especialmente al profesor Jaime Martín y Germán Cuervo por sus enseñanzas y por cultivarme el amor por la química

A los integrantes del Grupo Catálisis y a su director Alfonso Ramírez por acogerme en su grupo de Investigación y por ser más que un profesor un amigo

A mis compañeros de estudio Andrés Vivas, Paola Sotelo, Anderson Hoyos, Cristian Miranda, Gabriel Hurtado, Anuar Caldón y demás con quienes compartir momentos inolvidables. Los llevo en mi corazón

A Victoria Recalde por su gran ayuda desinteresada en el momento más oportuno

A Damaris Herrera, Carmen Muñoz, Zulima Jaimes, Mónica Lucumí, Andrea Henao, Carmen Micanquer Lilibiana Agudelo y Julián Ochoa del Ingenio Mayagüez por su incondicionalidad, apoyo y amistad Sincera en los momentos más difíciles

A Mabel Giraldo y María del Mar Domínguez por ofrecerme su amistad incondicional durante todos estos años

A Carmen Muñoz por su colaboración desinteresada en el transcurso de mi pasantía

A la familia Bunzel Correa por abrirme las puertas de su casa y mi familia en general por ser un soporte durante toda mi vida

A las personas que de una u otra forma fueron parte importante en la culminación de mi meta y que sería imposible nombrar a todas aquí, Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	14
1. ANTECEDENTES	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	18
3.1 Procesos de fermentación	18
3.2 Saccharomyces Cerevisiae	20
3.3 Procesos de Fermentación por Saccharomyces Cerevisiae	22
3.3.1 Parámetros en la fermentación alcohólica	22
3.3.2 Ph	22
3.3.3 Temperatura	23
3.3.4 Concentración de azúcares	23
3.3.5 Tolerancia a altas concentraciones de alcohol	24
3.3.6 Requerimientos de Oxígeno	24
3.3.7 Requerimientos nutricionales	24
3.4 Factores que generan ácidos orgánicos volátiles en el proceso fermentativo	25
3.4.1 Materia prima de fermentación	25
3.4.2 Contaminación de las melazas	26
3.4.3 Contaminación bacteriana	26
3.5 Ácidos Orgánicos Volátiles (AOV)	27
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5. METODOLOGÍA	31
5.1 Ubicación	31
5.2 Materiales y equipos	31
5.3 TÉCNICA INSTRUMENTAL	32
5.4 Creación del método analítico	33
5.5 Curva de Van Deemter	34
5.6 Métodos de Cuantificación	34
5.6.1 Método de adición estándar	34

5.6.2 Método del patrón interno	34
5.6.3 Método de curva de calibración	34
5.6.4 Métodos Cromatográficos	35
5.6.5 Curvas de Calibración	36
5.7 Análisis estadístico	38
5.7.1 Linealidad del método cromatográfico	38
5.7.2 Precisión del sistema cromatográfico	39
5.7.3 Repetibilidad del sistema	40
5.7.4 Exactitud del sistema cromatográfico	40
5.8 Recepción y obtención de muestras	42
5.8.1 Fermentación del mosto	43
5.8.2 Sedimentación y activación de la levadura	43
5.8.3 Muestreo	43
5.8.4 Tratamiento de muestras	43
6. RESULTADOS	47
6.1 Cromatogramas de los métodos de cuantificación	47
6.2 Cromatogramas de las muestras del proceso	50
6.3 Análisis estadístico para métodos	54
6.4 Prueba de Tukey de comparaciones múltiples	56
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MUESTRA POR JORNADA	60
7.1 Análisis estadístico para comparación entre jornadas	60
8. CONCLUSIONES	63
9. RECOMENDACIONES	65
10. BIBLIOGRAFÍA	66

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros establecidos de AOV en ppm en el Ingenio Mayagüez S.A	16
Tabla 2. Nombres IUPAC y común de AOV presentes en la fermentación Alcohólica	28
Tabla 3. Linealidad del método de altas concentraciones de AOV	39
Tabla 4. Linealidad del método de bajas concentraciones de AOV	39
Tabla 5. Linealidad del método individual de AOV	39
Tabla 6. Datos precisión y repetibilidad de las curvas de calibración de los Métodos cromatográficos	40
Tabla 7. Datos exactitud método de altas concentraciones de AOV	41
Tabla 8. Datos exactitud método de bajas concentraciones de AOV	42
Tabla 9. Datos exactitud método individual	42
Tabla 10. Normalidad de la prueba de Shapiro-Wilk para los AOV en Métodos	58
Tabla 11. Resumen prueba de Kruskal-Wallis en métodos de AOV	59
Tabla 12. Resumen prueba de Kolmogorov-Smirnov (Jornadas)	61
Tabla 13. Estadísticos descriptivos de los métodos cromatográficos	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama del proceso de fermentación para la obtención del alcohol anhidro para biocombustible	19
Figura 2. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	20
Figura 3. Destilería Ingenio Mayagüez S.A	31
Figura 4. Cromatógrafo de gases	33
Figura 5. Automuestreador	33
Figura 6. Curvas de Calibración Método Altas concentraciones	37
Figura 7. Curvas de Calibración Método Bajas concentraciones	37
Figura 8. Curvas de Calibración Método Individual	38
Figura 9. Materias Primas provenientes de la fábrica de azúcar del Ingenio Mayagüez S.A	43
Figura 10. Tanques de cultivo para propagación celular	43
Figura 11. Tanque de activación R-305, fermentador R-311 y R-312	43
Figura 12. Muestras de materia prima A) Miel B y B) Mezcla	44
Figura 13. Mostos del Tanque de activación R-305 y fermentadores R-311 R-312, R-313 y tanque de vino TK-335	45
Figura 14. Diagrama de tratamiento de muestras de materia prima	46
Figura 15. Diagrama de tratamiento de mostos y vino	46

Figura 16. Cromatograma de un patrón de 500ppm de ácido acético, Propiónico y butírico	46
Figura 17. Cromatograma de un patrón de 300ppm de ácido acético, propiónico, butírico y valérico	48
Figura 18. Cromatograma de un patrón de 1500ppm de ácido acético	49
Figura 19. Cromatograma de un patrón de 300pm de ácido propiónico	49
Figura 20. Cromatograma de un patrón de 300pm de ácido butírico	50
Figura 21. Cromatograma de un patrón de 250pm de ácido valérico	50
Figura 22. Cromatograma de una muestra de Miel B	51
Figura 23. Cromatograma de una muestra de Mezcla	52
Figura 24. Cromatograma de una muestra del tanque de vino TK-335	52
Figura 25. Cromatograma de una muestra del fermentador R-312	53
Figura 26. Cromatograma de una muestra del fermentador R-312	53
Figura 27. Cromatograma de una muestra del fermentador R-311	54
Figura 28. Cromatograma de una muestra de Miel B	55
Figura 29. Diagrama comparativo de líneas y de cajas de la cuantificación De ácido acético en los métodos cromatográficos bajas Concentraciones, altas e individual	54
Figura 30. Diagrama comparativo de líneas y de cajas de la cuantificación De ácido propiónico en los métodos cromatográficos bajas Concentraciones, altas e individual	55
Figura 31. Diagrama comparativo de líneas y de cajas de la cuantificación De ácido butírico en los métodos cromatográficos bajas Concentraciones, altas e individual	55
Figura 32. Diagrama comparativo de líneas y de cajas de la cuantificación De ácido valérico en los métodos cromatográficos bajas Concentraciones, altas e individual	56

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Datos curva de Van Deemter	60
Anexo 2. ANOVA en los métodos cromatográficos	62
Anexo 3. Tratamiento estadístico ácido acético	63
Anexo 4. Tratamiento estadístico ácido propiónico	64
Anexo 5. Tratamiento estadístico ácido butírico	65
Anexo 6. Normalidad y Homogeneidad de Varianzas Métodos	66
Anexo 7. Normalidad y Homogeneidad de Varianzas Jornadas	67

LISTA DE ACRÓNIMOS

AOV: Ácidos Orgánicos Volátiles

C.V: Coeficiente de variación

GR-X, GR, XP: Cepas de levadura mixtas

JUGO CLARO: Jugo obtenido del proceso de clarificación del picado de caña

LEVADURA: Organismos unicelulares facultativos

LDH: Lactato deshidrogenasa

MEZCLA: Mezcla de miel y jugo claro o agua utilizada como alimento en el proceso de fermentación

MIEL B: Solución de sacarosa que se obtiene del proceso de centrifugación de la caña

MOSTO: Sustancia azucarada susceptible a ser fermentada

%RSD: Desviación estándar relativa

SD: Desviación estándar

Valor p: Es la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido, suponiendo que la hipótesis nula es cierta

VINAZA: Subproducto restante del proceso de destilación

VINO: Producto de la fermentación del mosto

R-301: Tanque de propagación celular

R-302: Tanque de propagación celular

R-303: Tanque de propagación celular

R-305: Tanque de activación de la levadura

R-311: Tanque de fermentación de mosto en proceso

R-312: Tanque de fermentación de mosto en proceso

335: Tanque de vino (mosto fermentado listo para destilación)

S-331: Sedimentador de levadura

RESUMEN

En la búsqueda de nuevas alternativas energéticas, la obtención de biocombustibles generados de productos o subproductos agrícolas ha dinamizado las regiones agrícolas del país, intensificando monocultivos en forma masiva e inversión en la infraestructura física y generación de conocimiento sobre los procesos agroindustriales para producir biocombustibles, en este caso el alcohol etílico que además es utilizado en la elaboración de compuestos químicos y bebidas alcohólicas de interés comercial, generando nuevas oportunidades de trabajo en la industria y el campo. Este es el caso del Valle del Cauca, región de cultivo masivo de caña de azúcar, donde se pretende producir la mayor cantidad de alcohol etílico combustible para suplir la demanda del país en lo referente a biocombustible.

La fermentación Etanólica se realiza en presencia de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, este es un proceso biotecnológico complejo de las mieles de caña de azúcar, mediante el cual se obtiene alcohol etílico, este proceso genera además de alcohol etílico acidez volátil o ácidos orgánicos volátiles que son los responsables de inhibir el crecimiento de la levadura afectando de forma letal su desarrollo celular e incidiendo en las propiedades del producto final. Entre estos ácidos orgánicos volátiles (AOV) se encuentran el ácido acético, propiónico, butírico y valérico generados en el proceso de fermentación continua de los azúcares.

Para determinar y cuantificar con exactitud los AOV que afectan el proceso fermentativo en la destilería del Ingenio Mayagüez S.A se desarrollaron tres métodos de análisis por Cromatografía de Gases-FID para las diferentes muestras y se evalúa su concentración en las jornadas, mañana y tarde para conocer la acidez volátil generada en el proceso. Se implementó un método de análisis para altas concentraciones de AOV en materias primas (mieles, mezclas de mieles y vino), un método de bajas concentraciones de AOV para evaluar mostos fermentados y finalmente un método de cuantificación individual para cada uno de los ácidos orgánicos volátiles con el fin de realizar un seguimiento detallado de la acidez volátil en el proceso fermentativo. Se encontró que en las materias primas hay altas concentraciones de AOV que pueden inhibir el crecimiento de la levadura y afectar el proceso de fermentación, los rangos de concentraciones encontrados oscilan entre 300-2500ppm, 100-300ppm, 50-200ppm, 20-150ppm para ácido acético, propiónico, butírico y valérico respectivamente. Mientras que en el proceso fermenta-

tivo y tanque de vino los valores oscilan entre 50-500ppm, 20-250ppm, 20-200ppm y 20-100ppm para ácido acético, propiónico, butírico y valérico respectivamente.

Según los rangos encontrados de AOV en el proceso fermentativo se establece que la implementación y el uso de los métodos cromatográficos permiten la determinación y cuantificación temprana y confiable de ácidos orgánicos y el seguimiento de la acidez volátil por jornadas, siendo una herramienta importante para el correcto desarrollo del proceso fermentativo en la destilería del Ingenio Mayagüez S.A.

1. ANTECEDENTES

El proceso de producción de la destilería del Ingenio Mayagüez S.A presenta varias etapas fermentativas y según investigaciones desarrolladas en el laboratorio de la destilería se ha encontrado registro de cuantificación en mieles, jugo y mostos en las diferentes etapas del proceso de AOV. La tabla 1 identifica los sitios del proceso que han sido objeto de control para análisis de AOV y los parámetros establecidos como resultado de su análisis.

Se observa que no hay registros de concentración de AOV en todas las muestras de fermentación a excepción del tanque de vino, tampoco hay registro de concentración para ácido valérico en ninguna de las muestras, por ello se implementó un método cromatográfico para la determinación de la concentración de todos los AOV en el proceso de producción de alcohol carburante.

Tabla 1. Parámetros establecidos de AOV en ppm en el Ingenio Mayagüez S.A

	ACÉTICO	PROPIÓNICO	BUTÍRICO	VALÉRICO
MIEL B	500- 3000	30-250	100 – 220	NR
JUGO	500- 3000	30-250	100 – 220	NR
TANQUE 305	NR	NR	NR	NR
FERMENTADOR 311	NR	NR	NR	NR
FERMENTADOR 312	NR	NR	NR	NR
FERMENTADOR 313	NR	NR	NR	NR
TANQUE VINO 335	500- 3000	30-250	100 – 220	NR

Fuente: Ingenio Mayagüez S.A

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso de producción de etanol a partir de mieles de caña de azúcar a nivel industrial es llevado a cabo en presencia de bacterias y levaduras salvajes del género *Lactobacillus*, *acetobacter* y *gluconobacter*^[1] que generan ácidos orgánicos volátiles (AOV) tales como el propiónico, butírico, valérico y acético entre otros. Algunos de estos ácidos son indeseables dependiendo del uso y aplicación del alcohol etílico, en general estos ácidos se generan por limitaciones durante el ciclo fermentativo e inhiben el crecimiento de la levadura y afectan la calidad del producto.

Los AOV están presentes en la materia prima (mieles) de la caña de azúcar y además se generan en el proceso fermentativo por diferentes bacterias en mostos y vino.

La acidez de los AOV genera una gran competencia entre las bacterias presentes y la *saccharomyces cerevisiae* afectando los factores de crecimiento en el medio de fermentación y el crecimiento y viabilidad celular de la levadura. Por esa razón se hace necesario crear un método de cuantificación de AOV que permita hacer un seguimiento continuo al proceso por jornadas desde la materia prima hasta el producto final en la destilería del Ingenio Mayagüez S.A para establecer un control en todas las muestras de la fermentación, contribuyendo de manera positiva en la generación y producción de alcohol carburante en el Valle del cauca.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

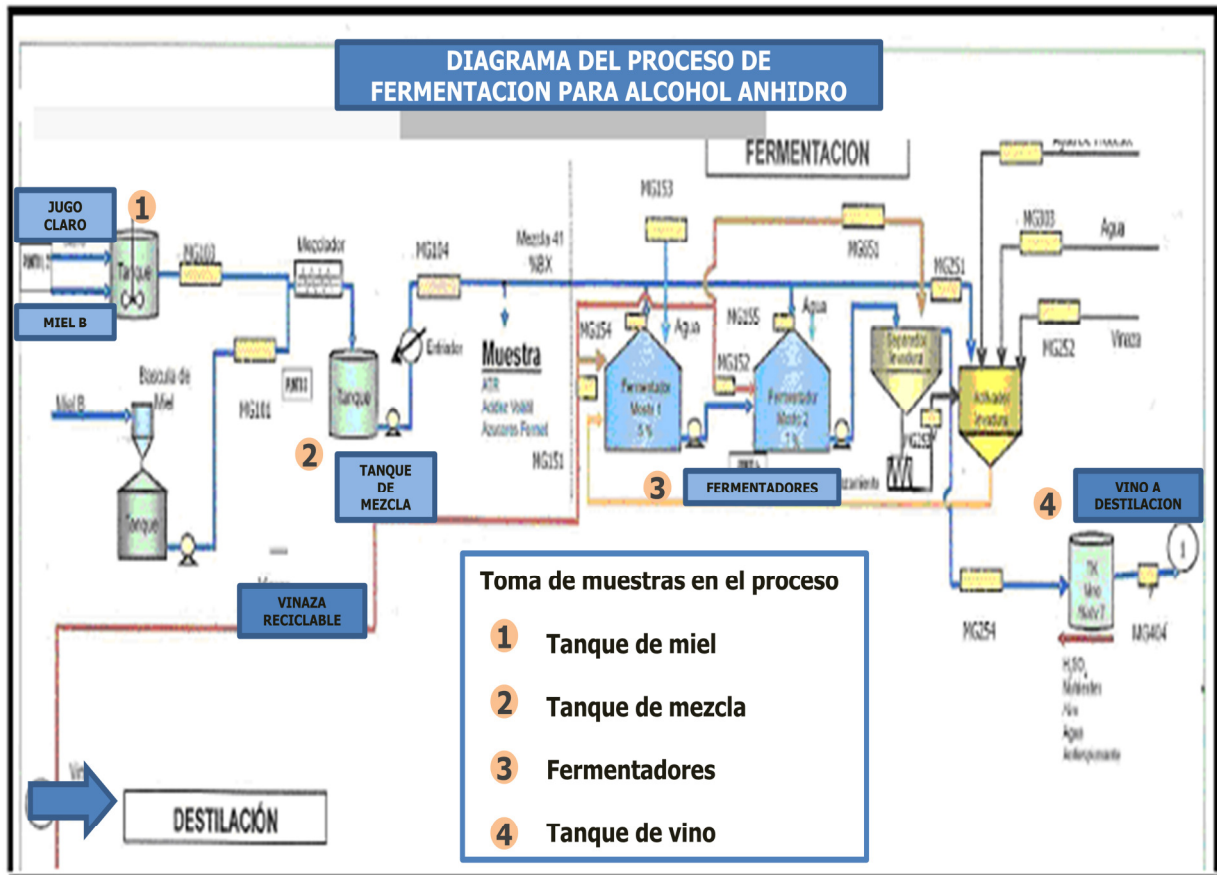
3.1 Procesos de fermentación

Existen varios tipos de fermentación, entre ellos se encuentran la fermentación discontinua o en Batch en la que el proceso es interrumpido para la obtención de metabolitos primarios; la fermentación alimentada o Fed-batch en la que los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación y el proceso de fermentación continua que se realiza con el objetivo de mantener una concentración de sustrato constante y, por consiguiente, mantener la población microbiana en fase de crecimiento exponencial^[2].

Este último proceso se utiliza en fermentaciones industriales que requieren actividad metabólica máxima. Se trabaja a volumen constante manteniendo el equilibrio entre el volumen del medio añadido y el que fluye transformado por la acción microbiana, este es utilizado en la destilería del Ingenio Mayagüez mediante un sistema abierto (no estéril por lo cual genera gran variedad de microorganismos que no pueden evitarse) donde una de las mayores desventajas es la vulnerabilidad a infecciones, cuando estas se producen se incrementa la producción de ácidos orgánicos volátiles que tienen impacto negativo sobre las condiciones fisiológicas de la levadura al inicio del crecimiento celular e inhibe considerablemente el desarrollo^[3].

La figura 1 representa la planta de destilación del Ingenio Mayagüez donde se realiza el proceso de producción de alcohol etílico, las etapas de fermentación y los sitios de muestreo en el control de la acidez volátil generada por los AOV.

Figura 1. Diagrama del Proceso de fermentación para la obtención del alcohol anhidro para Biocombustible.



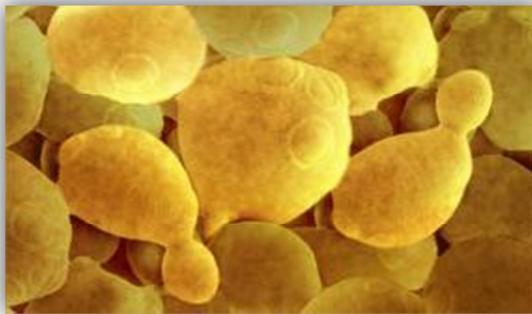
Fuente: Ingenio Mayagüez S.A

3.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Es uno de los microorganismos eucarióticos más estudiados, ya que su uso a nivel industrial es muy variado, no solo a nivel de producción de etanol y CO₂, sino de otros compuestos volátiles y no volátiles. Pertenece al reino Fungi y es de tipo unicelular, es una levadura facultativa, es decir, su componente enzimático y rutas metabólicas utilizadas le permiten habitar en ambientes aerobios, como anaerobios^[3].

Saccharomyces Cerevisiae (figura 2) es la especie de levaduras utilizada para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, es una cepa de fácil cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior^[4].

Figura 2. *Saccharomyces Cerevisiae*



La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo eucariote más estudiado y constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Se destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN^{[5],[6]}.

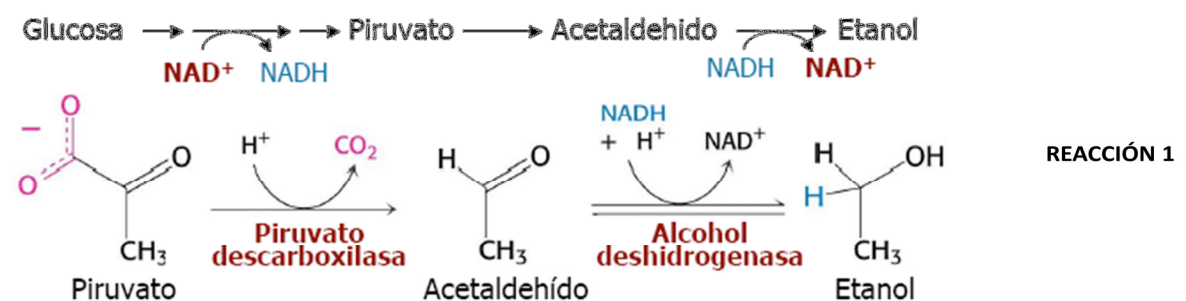
Las levaduras pueden ser haploides o diploides según el estadio del ciclo, no obstante ambos tipos celulares son estables y se pueden reproducir de forma asexual mediante mitosis. La división es por gemación, es decir, las células hijas son de tamaño inferior al de las células madre^[7].

La *Saccharomyces cerevisiae* realiza glucólisis en anaerobiosis y el piruvato generado tras este proceso se transforma luego por acción enzimática en alcohol en forma de etanol. En este proceso también hay producción de dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas^[7].

La glucólisis, ruta por la cual son metabolizadas las hexosas, se realiza en condiciones anaerobias sin la oxidación neta de los azúcares sustrato así como también en condiciones aerobias. El medio o ruta se selecciona dependiendo de las condiciones del proceso y los productos que se desea obtener.

Aunque la glucólisis (Reacción 1) y la respiración conservan la energía liberada en forma de ATP, en la glucólisis se genera una energía total mucho menor, es decir que por cada mol de sustrato catabolizado, la glucólisis produce menos energía total que la respiración completa^{[7],[8]}.

El tipo de glucólisis más común y más conocida es la vía realizada Embden-Meyerhoff.



La reacción global de la glucólisis se registra en reacción 2 donde a partir de la glucosa se obtienen 2 moléculas de piruvato y energía en forma de ATP que es la fuente de energía universal de la célula^[9].



Esta vía metabólica es realizada por la levadura en la etapa de reproducción como en la de fermentación para la posterior producción de etanol a partir de sustratos azucarados.

3.3 PROCESO DE FERMENTACIÓN POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE

3.3.1 Parámetros en la fermentación alcohólica

El mejoramiento del proceso fermentativo ha sido tema de investigación con diferentes cultivos de levaduras y diferentes condiciones físicas y químicas, diseño de reactores eficientes, utilización de mejores nutrientes en el medio de cultivo, todo esto con el fin de optimizar los parámetros de los procesos que conduzcan al máximo aprovechamiento de las materias primas y su productividad. Los parámetros más importantes a controlar en una fermentación alcohólica son el pH, la temperatura, concentración de azúcares, constituyentes del medio de cultivo, tolerancia a la concentración de alcohol y micronutrientes que mejoran las condiciones de las levaduras en fermentación^[2].

3.3.2 pH

El efecto del pH en una fermentación está relacionado directamente con el desarrollo de la levadura y la posterior formación de subproductos. El rango permitido se encuentra entre 3.1 a 4.0, Cuanto menor es el pH mayor dificultad tendrán las levaduras para fermentar, mientras que a pHs cercanos al neutro se facilita el desarrollo de flora microbiana contaminante del proceso y por ende la formación de subproductos indeseables^[10].

De esta manera se demuestra la importancia del pH y su optimización tanto para que la inversión del azúcar sea eficiente como para el buen desarrollo de la cepa de levadura y el control de formación de productos no deseados en el proceso^[11].

3.3.3 Temperatura

La fermentación puede transcurrir en un rango de temperatura entre 13°C -35°C. En este intervalo, cuanto mayor sea la temperatura mayor será la velocidad del proceso fermentativo siendo también mayor la proporción de productos secundarios^[12]. Sin embargo, a menor temperatura es más fácil conseguir un mayor grado alcohólico, ya que a altas temperaturas las levaduras agotan el proceso más rápido.

Estudios realizados en la Universidad de la Habana^[13] con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que cuando ocurre un sobrecalentamiento durante la fermentación para la producción de alcohol, la eficiencia es menor debido a la baja actividad enzimática y al estrés que sufre el microorganismo por afección de sus estructuras celulares, en la mayoría de casos también la muerte.

3.3.4 Concentración de azúcar

La concentración de sustrato fermentable (azúcares) al exterior de la célula de la levadura, constituyen un punto crítico en la actividad de estos microorganismos y por ende en el rendimiento.

En el caso de producción de alcohol a partir de sustratos azucarados deben ser estandarizadas dichas concentraciones para lograr la optimización del proceso. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de un sustrato azucarado muestra que la concentración de etanol incrementa cuando se eleva la concentración del sustrato ya que este influye en la actividad del microorganismo, pero dicho aumento repercute en el tiempo que toma la fermentación afectando la productividad debido a que el crecimiento y la actividad metabólica de muchos microorganismos se ve afectada por fuertes concentraciones de sustrato^[14].

3.3.5 Tolerancia a altas concentraciones de alcohol

El alcohol producido a partir del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* puede ser inhibitorio y tóxico en algunas ocasiones para la misma levadura pues afecta la función y estabilidad de enzimas citoplasmáticas y la función de los transportadores afectando el reconocimiento del sustrato.

La tolerancia al etanol es dependiente de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de su fluidez. No obstante otros factores como temperatura afectan dicha resistencia^{[13],[14]}.

3.3.6 Requerimientos de Oxígeno

El oxígeno como elemento es requerido por la levadura para la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados, componentes esenciales de sus membranas celulares, que le permiten en algunos casos soportar factores de estrés como temperatura, concentraciones de alcohol, sales, ácidos y azúcares^[15].

3.3.7 Requerimientos nutricionales

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos alimentos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

Estos compuestos juegan un papel importante en la fisiología de los microorganismos, los cuales mejoran las condiciones de las levaduras en fermentación y disminuyen los riesgos de contaminación del proceso y desviaciones metabólicas. Entre estos micronutrientes se encuentran el magnesio, manganeso, cobre, potasio, ácido pantoténico, biotina y tiamina necesarios en el metabolismo, crecimiento celular, actividad fermentativa y disminución en la sobreproducción de ácidos grasos de cadena corta tóxicos^[15].

3.4 Factores que generan ácidos volátiles en el proceso fermentativo

Un sin número de factores pueden afectar el proceso fermentativo y disminuir el rendimiento de alcohol y la productividad industrial. Estos factores deben ser controlados para minimizar las pérdidas de sustrato y maximizar las ganancias en términos de cantidad y calidad de producto.

De esta manera, el concepto de acidez volátil constituye uno de los factores a controlar durante la fermentación alcohólica pues incide en la calidad del alcohol y su excesiva concentración en una fermentación alcohólica inhibe el desarrollo del microorganismo fermentador. La concentración de ácidos volátiles producidos esta alrededor de 0.25-0.50g/L dependiendo de las condiciones de fermentación y en algunos casos incluso puede llegar a 1.5g/L ^[2].

Se ha encontrado que la acidez volátil puede ser producida a partir de la *Saccharomyces Cerevisiae* bajo ciertas condiciones de fermentación y los autores deducen que esta acidez es generada al inicio del crecimiento celular y es dependiente de la expresión de ciertos genes de la cepa de levadura ^[16].

La acidez volátil puede cuantificarse mediante cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cuantificando los miligramos de cada ácido volátil presente en la muestra analizada ^[17].

3.4.1 Materia prima de fermentación

Una de las materias primas más usadas a nivel Industrial para la producción de etanol y el principal subproducto de la industria azucarera son las melazas de caña, líquidos densos y viscosos de color oscuro producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa presente en la caña de azúcar, definidas como los residuos de la cristalización final del azúcar, de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos ^[18].

3.4.2 Contaminación de las melazas

Debido al tratamiento que se realiza a las melazas en el proceso de cristalización y por la naturaleza misma de la caña, este sustrato puede contener varias formas de contaminación bacteriana desde el cultivo de caña, lo que en términos de producción de ácidos orgánicos implica la disminución en la actividad y crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae*, por lo tanto una disminución en el rendimiento de alcohol y la posterior generación de características indeseables en el producto final^[2].

3.4.3 Contaminación bacteriana

Los diversos factores que afectan el rendimiento y la productividad de la levadura en el proceso de fermentación están subdivididos en Intrínsecos y extrínsecos.

Los intrínsecos son referidos a factores inherentes a la levadura y los extrínsecos son aquellos que están relacionados con el medio en el que la fermentación es llevada a cabo^[7].

Los factores intrínsecos se representan por las propiedades de las levaduras como:

- Capacidad de convertir mayor cantidad de azúcares en etanol
- Capacidad de utilizar mayor diversidad de carbohidratos para la producción de alcohol
- Mayor actividad de crecimiento en la fermentación
- Mayor resistencia a concentraciones elevadas de alcohol y de sustrato
- Resistencia a condiciones adversas del medio como pHs extremos y presencia de ácidos y otros compuestos inhibidores^[2].

Los factores extrínsecos afectan la levadura y actúan dificultando la supervivencia o reduciendo la velocidad global del metabolismo, ellos son:

- Control de pH en composición de ácidos

- Control de la concentración de sustrato (azúcar) y producto final (etanol)
- Ajuste de minerales y micronutrientes
- Control y distribución de la temperatura
- Control de aireación y agitación
- Control de los microorganismos contaminantes o competidores ^[2].

Un ácido no afecta de forma importante la supervivencia de la levadura, pero si reduce altamente su eficiencia y productividad en el proceso.

El efecto contaminante de los ácidos orgánicos volátiles sobre la levadura puede causar:

1. Una reducción de la productividad y rendimiento fermentativo
2. Reducción de la vitalidad de las células de levadura debido a la intoxicación por metabolitos del contaminante
3. Floculación de las levaduras a causa de las células bacterianas ^[2].

3.5 Ácidos Orgánicos Volátiles (AOV)

Los AOV pueden llegar a inhibir el crecimiento de las levaduras, por ejemplo cuando se alcanzan concentraciones de 0.8% y 0.05% de ácido láctico y acético respectivamente, se afecta de forma letal el desarrollo celular. Dichos niveles se producen cuando las bacterias fermentadoras han sido aisladas en plantas productoras y tienen origen en sustratos azucarados ^[2].

Estos ácidos orgánicos volátiles se generan directamente por acción de las bacterias presentes en el proceso de fermentación y alteraciones microbianas que disminuyen el crecimiento y la viabilidad celular de la *Saccharomyces Cerevisiae*, al generarse una competencia entre la levadura y las bacterias.

Los AOV formados durante la fermentación o como consecuencia de alteraciones microbianas son, principalmente: ácido Acético, ácido Propiónico, ácido Butírico y Valérico. En la tabla 2 se registran los nombres IUPAC y común de los AOV.

Tabla 2. Nombre IUPAC y común de los AOV presentes en la fermentación alcohólica

Nombre IUPAC	Nombre Común
Ácido etanóico	Acido Acético
Ácido pentanóico	Acido valérico
Ácido 1-propanocarboxílico	Acido Butírico
Ácido propanoico	Acido Propiónico
2-hidroxi-propanoico	Ácido láctico
(E)-butenodioico	Ácido fumárico

➤ **Ácido acético $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$**

Se genera por la oxidación del alcohol etílico a ácido acético conocida como fermentación acética. Las principales características de la fermentación acética es un fuerte incremento en la acidez y aparición del típico olor a vinagre

El ácido acético junto con los ácidos propiónico, butírico y sulfúrico componen la acidez volátil de los alcoholes que se producen por la acción de las *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas que mediante fermentación bacterial transforman el etanol en acetaldehído por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa que es un grupo de siete enzimas que están frecuentemente presentes en muchos organismos y facilitan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción de NAD^+ a NADH . Luego mediante un proceso oxidativo el acetaldehído es convertido en ácido acético (Reacción 3)^[15].

La reacción catalizada es:



La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre 28°C y 30°C.

➤ **Ácido Propiónico $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$**

Se produce en la fermentación de los azucares por propionibacterias^[7].

➤ **Ácido Butírico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$**

Producido por las bacterias esporógenas anaerobias estrictas del genero *Clostridium* a partir de azúcares y otros sustratos como el ácido láctico y la glicerina también generados en el proceso de fermentación. La bacteria *C. pasterianum* puede producir a partir de sacarosa o glucosa, ácido butírico entre otros compuestos ^[7]. En la fermentación ácido butírica se producen ácidos orgánicos tales como el butírico, acético y fórmico bajo condiciones anaeróbicas. Las principales características de la fermentación butírica son el fuerte incremento en la acidez e incremento del olor desagradable o rancio ^[7].

➤ **Ácido Valérico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$**

El ácido valérico se produce a partir del piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en procesos de fermentación. Este ácido puede ser producido en mayor o menor proporción por bacterias homofermentativas que utilizan las hexosas siguiendo la vía de Embden Meyerhof ^[11].

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar y estandarizar una técnica para la determinación y cuantificación de ácidos orgánicos volátiles en el proceso de fermentación alcohólica, utilizando cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar y cuantificar los ácidos orgánicos volátiles que se generan en el proceso inicial de fermentación alcohólica en la destilería del Ingenio Mayagüez S.A.
- Encontrar las mejores condiciones cromatográficas para lograr la separación de los ácidos volátiles presentes.
- Estandarizar la técnica de limpieza y extracción de ácidos volátiles en las mieles, mostos y vino.
- Evaluar la concentración de ácidos volátiles en la materia prima, proceso y productos mediante cromatografía de gases.

5. METODOLOGÍA

5.1 UBICACIÓN

La presente investigación se desarrolló en la destilería del Ingenio Mayagüez S.A, ubicado en el municipio de Candelaria en el departamento del Valle del Cauca (figura 3).

Figura 3. Destilería Ingenio Mayagüez S.A



5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

- Cromatógrafo de Gases SHIMADZU, Modelo 2010 Con Auto Muestreador
- Columna SH 20 (WAX) de 50M x 0.32ID, 1.0 μm de espesor de película (POLAR)
- Equipo de Destilación, Fabricante: Trade Raypa, Modelo: ALCOTEST
- Balanza Analítica, Fabricante: OHAUS, Modelo: Adventurer

5.3 TÉCNICA INSTRUMENTAL

La cromatografía de gases (GC) es una técnica altamente usada en la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna en donde los compuestos son separados y llevados a un detector que determina cuanto analito ha salido de la columna, para finalmente ser registrados como picos cromatográficos.

La CG es una metodología efectiva y su performance permite una amplia gama de posibilidades para la química analítica en compuestos orgánicos.

La sensibilidad de la técnica GC puede incluso detectar microgramos del analito si está bien implementada. La cuantificación se basa en cálculos del área bajo la curva que es proporcional a la concentración del analito.

El detector FID es uno de los detectores más usados y versátiles en cromatografía de gases. Básicamente es un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta temperatura. La mayoría de compuestos orgánicos al someterse a altas temperaturas pirolizan y se producen iones y electrones, que son conductores eléctricos. Este hecho se aprovecha estableciendo una diferencia de potencial de unos centenares de voltios entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama. La corriente generada es baja (del orden de los 10^{-12} A), por lo tanto debe ser amplificada mediante un amplificador de alta impedancia.

El proceso de ionización que se da en la llama es complejo, pero se puede aproximar el número de iones producidos al número de átomos de carbono transformados en la llama. Esto produce que sea un detector sensible a la masa más que a la concentración, por lo tanto no le afectan demasiado los cambios en el flujo de salida.

5.4 CREACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La evaluación de los AOV en materia primas y mostos se realizó con un cromatógrafo de gases SHIMADZU (figura 4), Modelo 2010 Con Auto Muestreador (figura 5), equipado con detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar SH 20 (WAX) de 50m x 0.32ID, 1.0 μm de espesor de película (POLAR); el gas acarreador fue helio, a un flujo de 1.91 mLmin⁻¹ determinado mediante Curva de Van Deemter. Se aplicó un programa de temperatura de 70 °C (por 5min) con una rata de 30 hasta 220 °C (por 7min); la temperatura del detector fue de 280 °C y la del inyector de 240 °C.

Para la identificación y cuantificación de los AOV se utilizaron estándares de Sigma-Aldrich, Fluka Ácido Butírico 99.5%, Ácido Valérico 99.8%, Merck Ácido acético 99.8% y Panreac Ácido propiónico 99.85%. Las curvas de calibración se hicieron con el método de estándar externo en el que se representan los valores de las áreas frente a la concentración del analito para cada uno de los compuestos de interés con un rango de concentración de los compuestos de mgL⁻¹. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

Se realizan varios ensayos en el equipo para establecer las condiciones de presión, temperaturas, flujo, velocidad lineal, flujo del make up (Helio: gas de arrastre), flujo de H₂ y flujo de Aire

Figura 4. Cromatógrafo de gases



Figura 5. Automuestreador



5.5 CURVA DE VAN DEEMTER

La curva de Van Deemter se empleó para determinar el flujo óptimo de la columna cromatográfica antes de implementar los métodos de cuantificación y se construye mediante la variación de los parámetros registrada en la ecuación de Van Deemter $H = A + B/u + Cu$ donde:

A: Término multicaminos

B/u: Término de difusión longitudinal

Cu: Término de transferencia de masas

u: velocidad lineal

Esta ecuación relaciona no solamente la eficiencia de la columna con la velocidad lineal, sino también con otros parámetros tales como relaciones de capacidad, diámetro de partícula, coeficientes de difusión del soluto en la fase estacionaria y móvil, etc. Su estudio proporciona información importante acerca del sentido en el que deben orientarse los cambios en diversos factores cromatográficos para mejorar la eficiencia en la cromatografía^[5]. En el anexo 1 se registran los datos de los parámetros de la curva.

5.6 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

5.6.1 Método de adición de estándar: Consiste en preparar los patrones con la muestra a analizar y añadir una cantidad conocida de la especie química a determinar. Es aconsejable para muestras complejas o matrices difícilmente reproducibles en los patrones.

5.6.2 Método del Patrón interno: Consiste en adicionar una cantidad conocida de un compuesto no presente en la matriz de la muestra, tanto a los estándares como a la muestra problema. Es aconsejable para minimizar fluctuaciones instrumentales y establecer referencias con fines cualitativos y cuantitativos.

5.6.3 El método de Curva de Calibración: Se basa en la existencia de una relación en principio lineal entre un carácter medible (área) y la variable a determinar (concentración). En este método se efectúan diluciones de las muestras de concentración conocida y se analizan en el equipo, estableciendo una función mate-

mática que relaciona ambas variables, después se lee el mismo carácter en la muestra problema. Así la respuesta de la muestra puede cuantificarse y empleando la curva de calibración, se puede interpolar el dato de la muestra problema hasta encontrar la concentración del analito^[16].

5.6.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Inicialmente se implementó un método cromatográfico global para la cuantificación de AOV en todas las muestras de proceso y de materia prima, pero se encontraron valores muy diversos con lo cual las estadísticas calculadas perdieron representatividad y afectaban la comparabilidad y confiabilidad de los métodos y por ende las conclusiones que pudieran inferirse experimentalmente.

Después de realizar varios ensayos se logró establecer que cada uno de los ácidos Orgánicos volátiles se encuentra en concentraciones diferentes en cada una de las muestras a analizar, debido a esto se trazaron curvas de calibración con rangos de concentración adecuados para cuantificar cada ácido según la muestra. Para lograrlo se establecieron tres métodos distintos en el equipo. Cada método de cuantificación es desarrollado dependiendo de las etapas del proceso fermentativo y las diferencias en concentración de AOV.

- **Método para altas concentraciones de AOV:** Este método es utilizado para cuantificar los ácidos orgánicos volátiles acético, propiónico y butírico específicamente en muestras que contienen altas concentraciones de ácidos, como lo son las materias primas de entrada a fermentación, miel b y mezcla, así como de mostos de los fermentadores, vinaza y el tanque de vino. Es de anotar que el ácido valérico no es incluido en este método porque se encuentra en muy bajas concentraciones en este tipo de muestras.
- **Método para bajas concentraciones de AOV:** Este método cuantitativo es usado en muestras que generalmente contienen bajas concentraciones de los ácidos orgánicos acético, propionico, butírico y valérico como lo son las muestras del tanque de activación de levadura y el mosto del tanque de fermentación 311.

- **Método de curva de calibración para la cuantificación y seguimiento individual de AOV en todas las muestras de fermentación:** Este es un método selectivo implementado para cuantificar de forma individual cada ácido.

5.6.5 Curvas de Calibración

Figura 6. Curvas Altas concentraciones de AOV

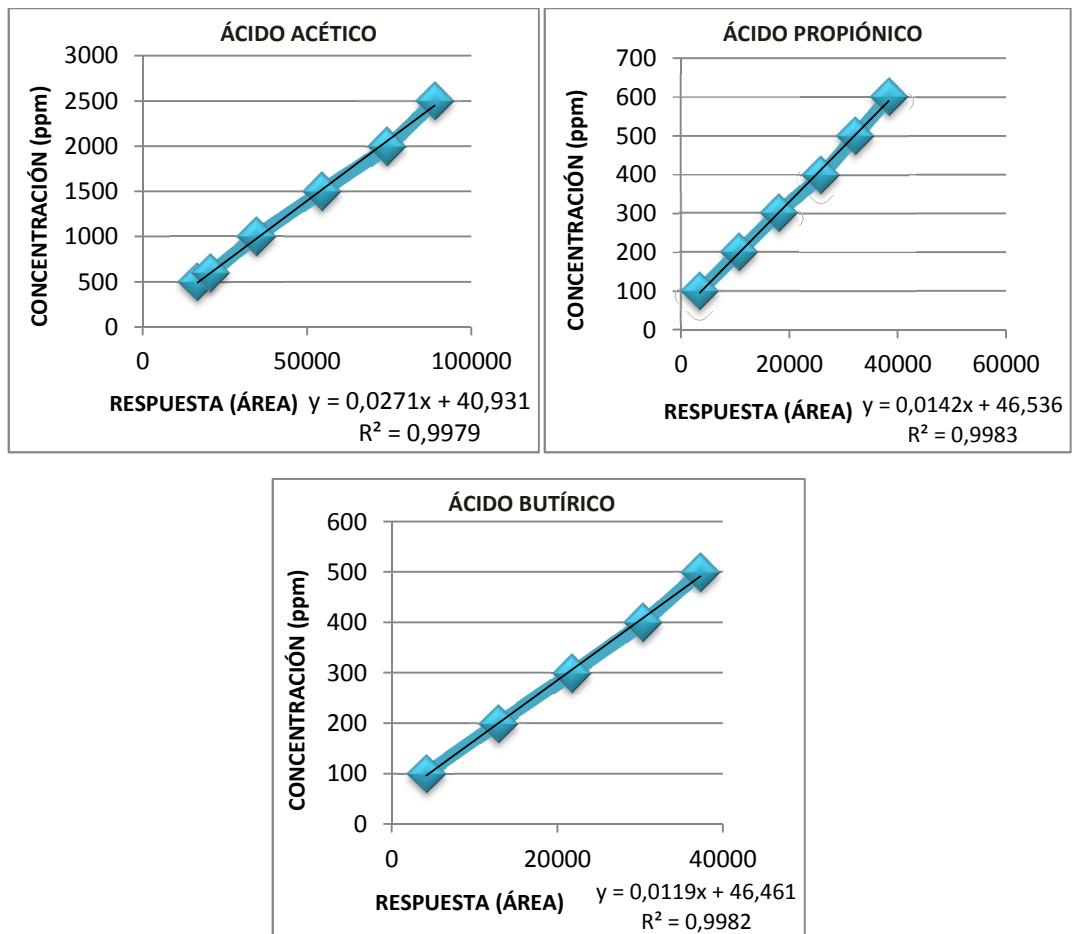


Figura 7. Curvas Bajas concentraciones de AOV

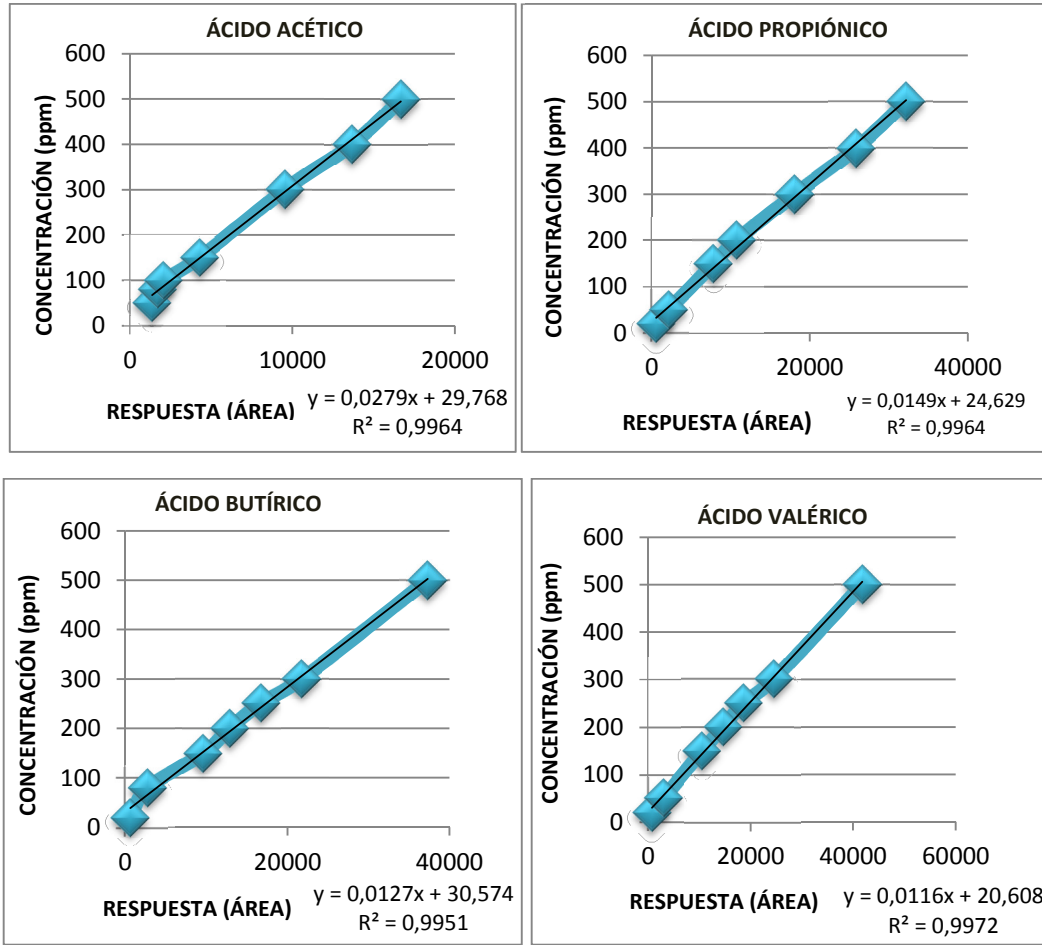
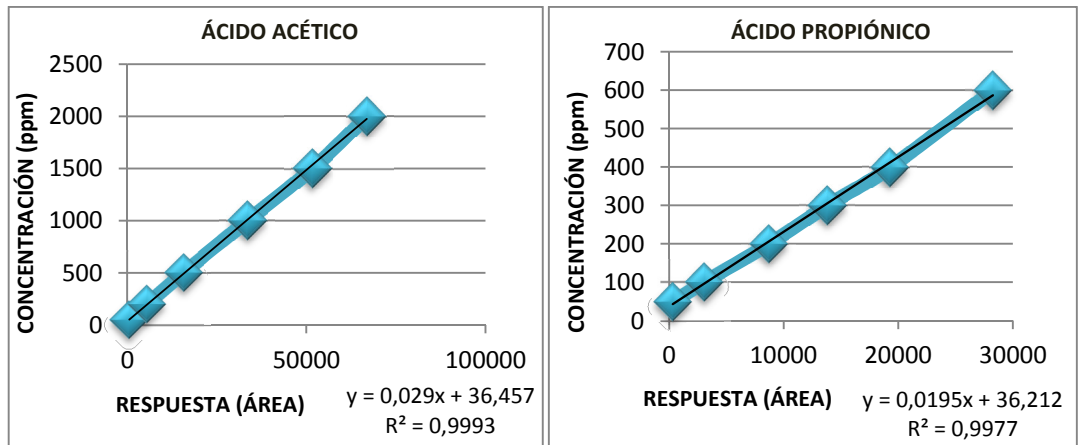
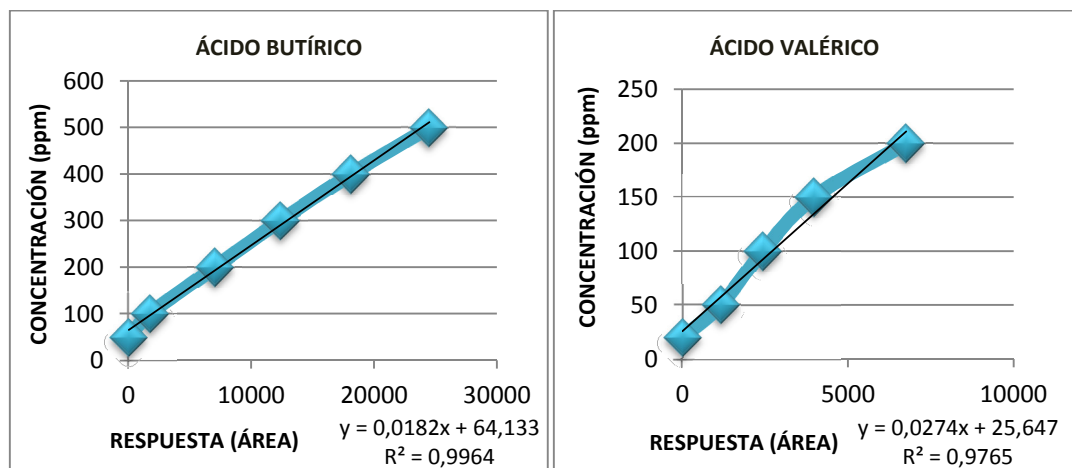


Figura 8. Curvas Método Individual de AOV





5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros determinados en la validación de los métodos cromatográficos de análisis fueron linealidad, precisión, repetibilidad y exactitud.

5.7.1 Linealidad del Método Cromatográfico

La linealidad es la capacidad de un método analítico de generar resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo determinado de concentraciones. En las tablas 3, 4 y 5 se presentan los parámetros estadísticos de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación para el método de altas y bajas concentraciones al igual que el método de cuantificación individual de AOV. Los valores de R nos indican que las curvas de calibración tienen valores de linealidad permitidos, cumpliendo con los criterios de aceptación para los métodos cromatográficos.

Tabla 3. Linealidad del método de altas concentraciones de AOV

Parámetro Estadístico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Ácido Butírico
A	2.73E-2	1.42E-2	1.1918E-2
B	40.93	46.54	46.46
R	0.9990	0.9991	0.9991

A: Pendiente **B:** intercepto, **R:** Coeficiente de correlación

Tabla 4. Linealidad del método de bajas concentraciones de AOV

Parámetro Estadístico	Acido Acético	Acido Propiónico	Acido Butírico	Acido Valérico
A	2.788542E-2	1.48829E-2	1.26612E-2	1.16109E-2
B	29.76	24.63	30.58	20.61
R	0.9982	0.9982	0.9975	0.9986

A: Pendiente B: intercepto, R: Coeficiente de correlación

Tabla 5. Linealidad del método individual de ácidos orgánicos

Parámetro Estadístico	Acido Acético	Acido Propiónico	Acido Butírico	Acido Valérico
A	2.901821E-2	1.95026E-2	1.825001E-2	3.436265E-2
B	36.44	36.21	64.13	15.55
R	0.9997	0.9989	0.9982	0.9992

A: Pendiente B: intercepto, R: Coeficiente de correlación

5.7.2 Precisión del Sistema Cromatográfico

La precisión es la concordancia en la repetición de valores en ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea, en este caso para el método de altas concentraciones de AOV se preparó un patrón de 500ppm de ácido acético, propiónico y butírico en 50mL y se inyectó seis veces en el cromatógrafo de gases para determinar la precisión del método cromatográfico. El mismo procedimiento se realizó para el método de bajas concentraciones para el que se preparó un patrón de 300ppm de cada uno de los AOV.

Para determinar la precisión del método individual se prepararon 4 patrones, cada uno de 500ppm en 50mL para cada ácido, se inyectaron por separado 6 veces en el equipo y se obtuvieron los valores de precisión dentro del criterio de aceptación ($C.V \leq 2\%$).

En la tabla 6 se observan los valores de desviación estándar y porcentaje de desviación estándar relativa de la precisión y repetibilidad de los AOV en los métodos cromatográficos.

Tabla 6. Datos precisión y repetibilidad de las curvas de calibración de los métodos cromatográficos

ÁCIDO	MÉTODO	ESTADÍSTICO			
		PRECISIÓN		REPETIBILIDAD	
		SD	%RSD	SD	%RSD
ACÉTICO	ALTAS CONCENTRACIONES	309.85	1.86	1.46	1.51
PROPIÓNICO		452.5	1.59	0.61	0.66
BUTÍRICO		232.71	0.67	0.82	0.86
ACÉTICO	BAJAS CONCENTRACIONES	94.72	0.99	0.94	0.88
PROPIÓNICO		252.6	1.48	1.02	1.03
BUTÍRICO		235.6	1.18	1.32	1.44
VALÉRICO		263.6	1.24	1.01	1.10
ACÉTICO	INDIVIDUAL	48717.4	1.29	0.77	0.84
PROPIÓNICO		91.48	0.67	1.22	1.25
BUTÍRICO		56.12	0.84	1.61	1.68
VALÉRICO		55.8	0.83	8.87	9.13

5.7.3 Repetibilidad del Sistema Cromatográfico

La repetibilidad es la cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, efectuadas en las mismas condiciones de medición.

Para la determinación de la repetibilidad en el método de altas concentraciones se preparó un patrón de 500ppm de cada uno de los ácidos, en el método de bajas concentraciones se preparó un patrón de 300ppm de todos los ácidos y en el método individual se prepararon 4 patrones, un patrón de 1000ppm para ácido acético, 450ppm para ácido propiónico, 300ppm para ácido butírico y 220ppm para ácido valérico. Los valores de SD y %RSD para la repetibilidad se registran en la tabla 6 que cumplen con los criterios de aceptación respectivos.

5.7.4 Exactitud del sistema Cromatográfico

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Para determinar la exactitud de los métodos

analíticos se usó el porcentaje de recuperación de la concentración teórica contra la concentración experimental usando los datos de la linealidad del método. Las tablas 7, 8 y 9 registran los valores de SD y %RSD de la exactitud de los tres métodos cromatográficos, los cuales se encuentran dentro de los criterios de aceptación (% C.V menor o igual al 2%).

Tabla 7. Datos exactitud método altas concentraciones

ACÉTICO		PROPIÓNICO		BUTÍRICO	
SD	%RSD	SD	%RSD	SD	%RSD
1.61	1.55	0.29	0.31	0.19	0.2
1.75	1.74	0.34	0.34	0.86	0.86
1.4	1.42	0.1	0.09	0.56	0.55
0.72	0.71	0.53	0.53	0.69	0.69
0.13	0.12	0.42	0.42	0.4	0.41
0.25	0.25	0.51	0.52	0.26	0.28

Tabla 8. Datos exactitud método bajas concentraciones

ACÉTICO		PROPIÓNICO		BUTÍRICO		VALÉRICO	
SD	%RSD	SD	%RSD	SD	%RSD	SD	%RSD
2.58	1.52	13.43	4.8	5.55	2.15	2.78	2.35
0.66	0.56	0.37	0.23	1.05	1.08	0.3	0.3
1.04	1	0.47	0.45	0.34	0.31	0.21	0.21
0.63	0.57	0.34	0.34	0.86	0.86	1.49	1.49
0.66	0.65	0.7	0.69	0.85	0.87	1.93	1.92
1.61	1.55	0.53	0.51	0.56	0.55	3.23	3.1
2.58	1.52	0.42	0.42	0.69	0.68	4.41	4.16

Tabla 9. Datos exactitud método individual

ACÉTICO		PROPIÓNICO		BUTÍRICO		VALÉRICO	
SD	%RSD	SD	%RSD	SD	%RSD	SD	%RSD
0.58	0.58	0.11	0.14	0.03	0.02	0.13	0.12
1.01	1.03	0.91	0.94	0.2	0.21	0.63	0.59
0.96	0.97	0.91	0.91	0.27	0.28	0.79	0.82
0.38	0.38	0.42	0.41	0.45	0.47	0.87	0.91
1.68	1.73	0.038	0.038	0.0063	0.0064	0.77	0.75
1.19	1.21	0.24	0.25	0.97	0.94	-----	-----

5.8 Recepción y obtención de muestras

El proceso de fabricación de alcohol carburante se inicia con la recepción y adecuación de las materias primas provenientes de fábrica (figura 6), las cuales se obtienen del proceso de fabricación de azúcar.

Figura 9. Materias primas provenientes de la fábrica de azúcar del Ingenio Mayagüez S.A



La materia prima utilizada es miel b, meladura, jugo claro, dependiendo de la disponibilidad de la misma y de las condiciones del proceso.

Una vez adecuada la materia prima se procede a fermentar. Se tienen tres cepas alcohólicas con las que se trabaja GR-X, GR Y XP. El proceso de fermentación está compuesto de dos subprocesos consecutivos: desarrollo de cultivo en el laboratorio y la propagación celular del arranque de la planta.

La propagación celular se realiza por etapas en cada uno de los tanques R-301, R-302, R-303. (Figura 7)

Figura 10. Tanques de cultivo para propagación celular



5.8.1 Fermentación del mosto

La fermentación se lleva a cabo en dos fermentadores operados en serie y en forma continua incluyendo al reactor de activación de levadura (figura 8), en el se reproduce constantemente biomasa que es alimentada a los fermentadores para mantener células frescas en el sistema y conservar la población.

Figura 11. Tanque de activación R-305, fermentador R-311y R-312



La mezcla preparada de miel y jugo claro alimenta los fermentadores y al tanque de activación junto con la vinaza enfriada (de la destilación) y el agua del proceso. Todos los fermentadores están provistos de agitadores para mantener el vino en condiciones uniformes y enfriadores que remueven el calor, manteniendo una temperatura óptima en el fermentador. El mosto fermentado rebosa del fermentador R-311 al R-312.

5.8.2 Sedimentación y activación de la levadura

Esta etapa del proceso es opcional dependiendo de la cepa de levadura con la que se esté trabajando. La levadura que sale con el mosto cuando se alcanza el grado alcohólico requerido se sedimenta usando su propiedad floculante y se bombea al tanque de activación de levadura (R-305). Esta operación se lleva a cabo en el sedimentador S-331.

La levadura sedimentada se activa con cantidades pequeñas de alimento (miel y mezcla) que son adicionadas, así como nutrientes, antibiótico, aditivo y aire. Esta levadura activada se lleva a los primeros fermentadores para continuar con el ci-

clo. El tanque de activación de levadura es usado durante el arranque como pre fermentación, donde las células de levadura de la sección de propagación son descargadas a los fermentadores.

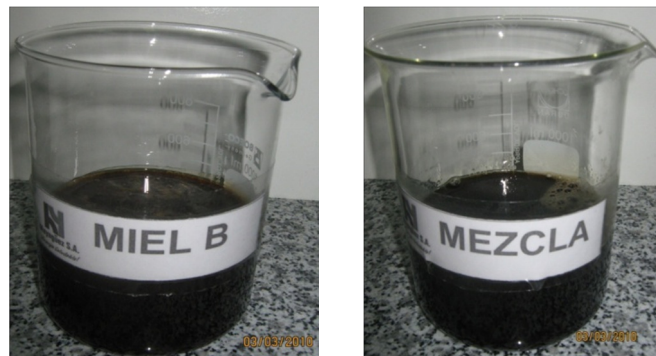
5.8.3 MUESTREO

El análisis de ácidos volátiles se realizó en la materia prima de entrada a fermentación (Figura 9), Mosto del tanque de activación R-305 y tanques de fermentación R-311 y R-312 (Figura 10) incluyendo el tanque de vino 335. Se tomaron dos muestras diarias a las 7am y 2pm y poder realizar el seguimiento de la acidez volátil y las variaciones del proceso.

5.8.4 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de materia prima (figura 9) y de fermentación (figura 10) necesitan un pre-tratamiento, como se indica en las figuras 11 y 12 antes de ser analizadas, incluyendo la destilación para eliminar los azúcares provenientes de las muestras que pueden dañar la columna. La destilación se realiza en un equipo ALCOTEST.

Figura 12. Muestras de materia prima A) Miel B y B) Mezcla



A

B

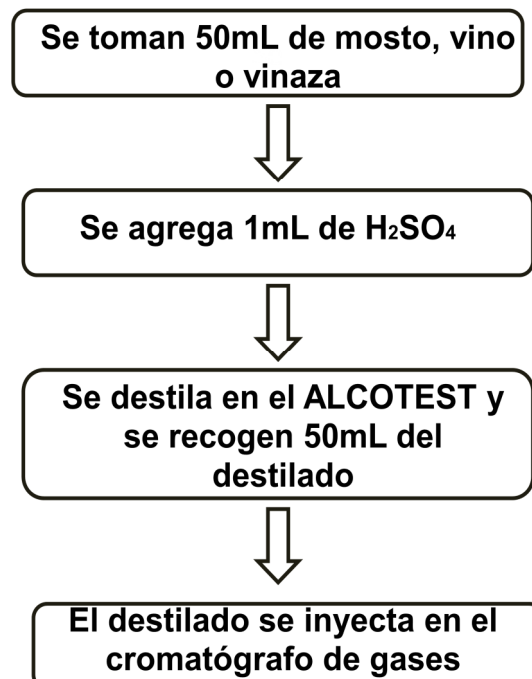
Figura 13. Mostos del tanque de Activación R-305 y fermentadores R-311, R-312, R-313 y tanque de vino TK-335



14. Diagrama de tratamiento de muestras de materia prima (Miel b y Mezcla)



Figura 15. Diagrama de tratamiento de mostos y vino



6. RESULTADOS

Al realizar el análisis cromatográfico se obtuvieron picos con una buena resolución a diferentes tiempos de retención para cada ácido.

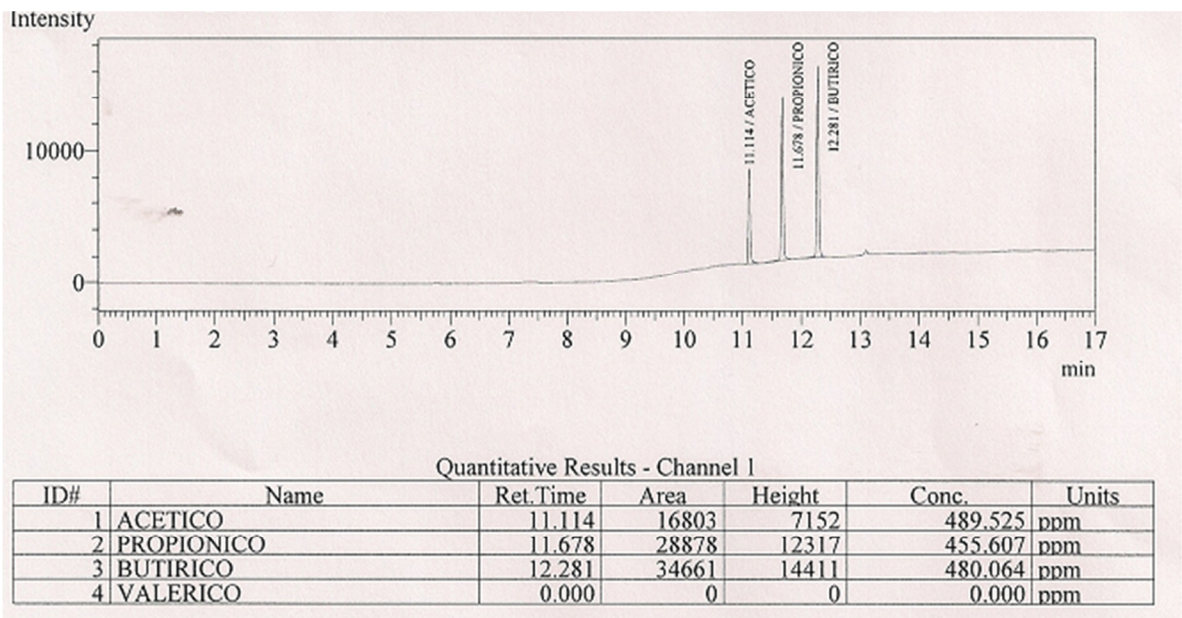
El ácido acético fue retenido a 11.114min, el ácido propiónico a 11.678min, el ácido butírico tuvo un tiempo de retención de 12.281min y el ácido valérico fue retenido a 13.102min.

El ácido valérico fue el analito retenido por más tiempo en la columna SH20WAX polar.

6.1 CROMATOGRAMAS DE LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

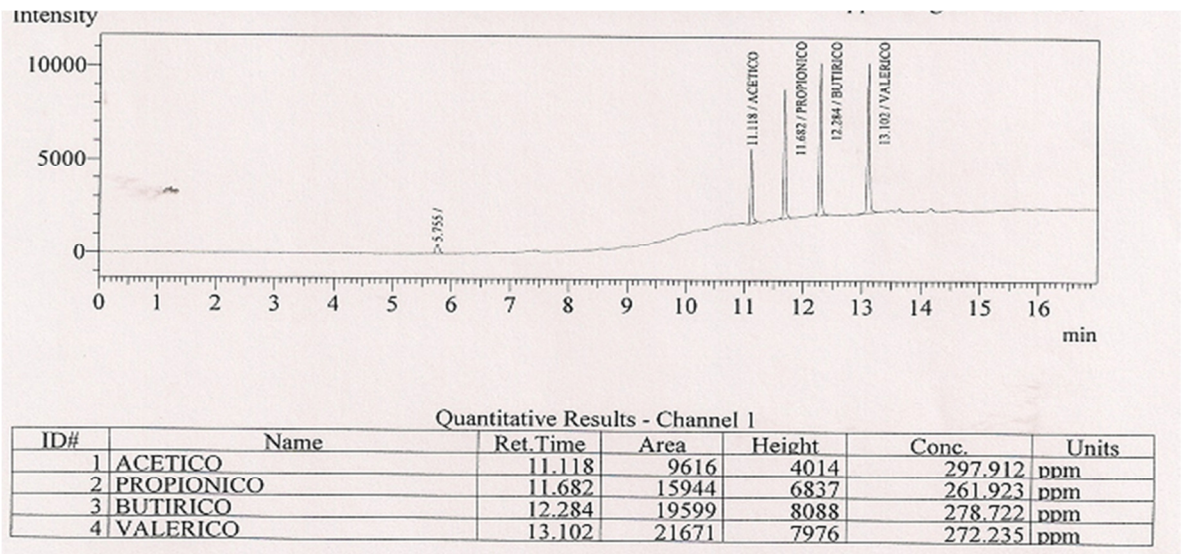
➤ Método de Altas concentraciones de AOV

Figura 16. Cromatograma de un patrón de 500ppm de ácido Acético, Propiónico y Butírico



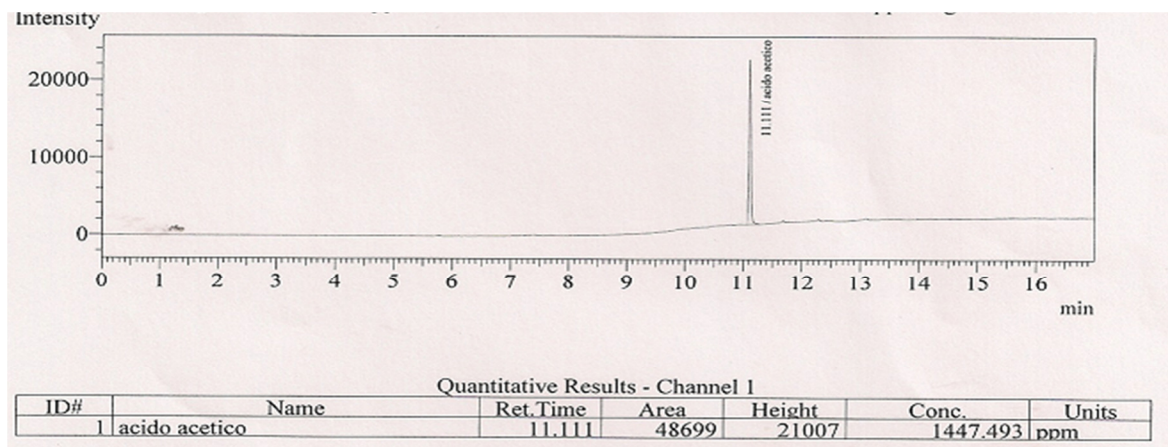
➤ Método de Bajas concentraciones de AOV

Figura 17. Cromatograma de un patrón de 300ppm de ácido acético, propiónico, butírico y valérico



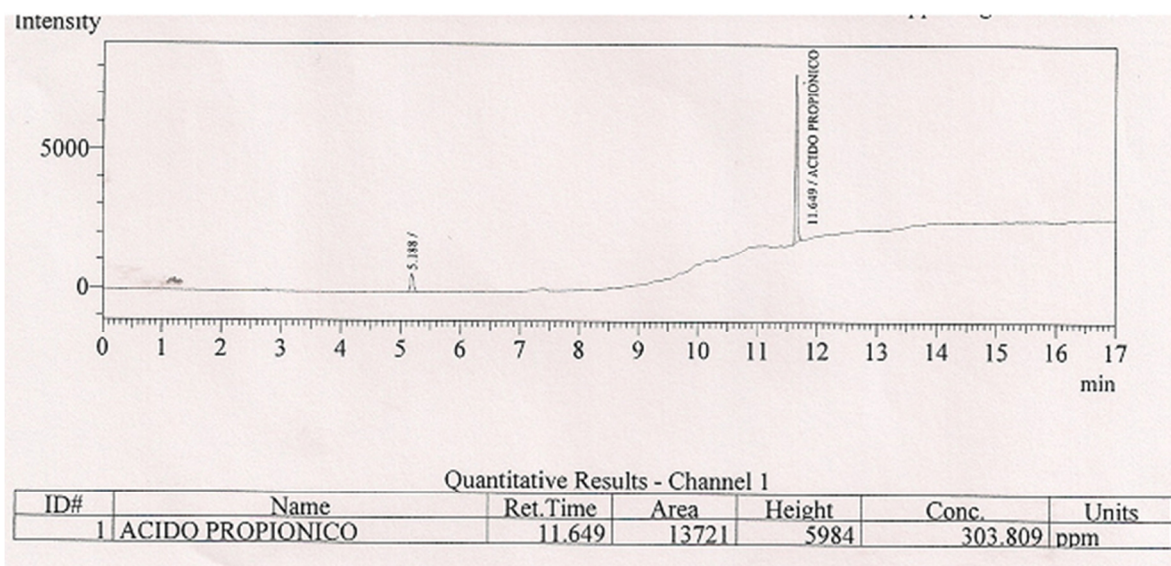
➤ Método Individual de Ácido Acético

Figura18. Cromatograma de un patrón de 1500ppm de ácido acético



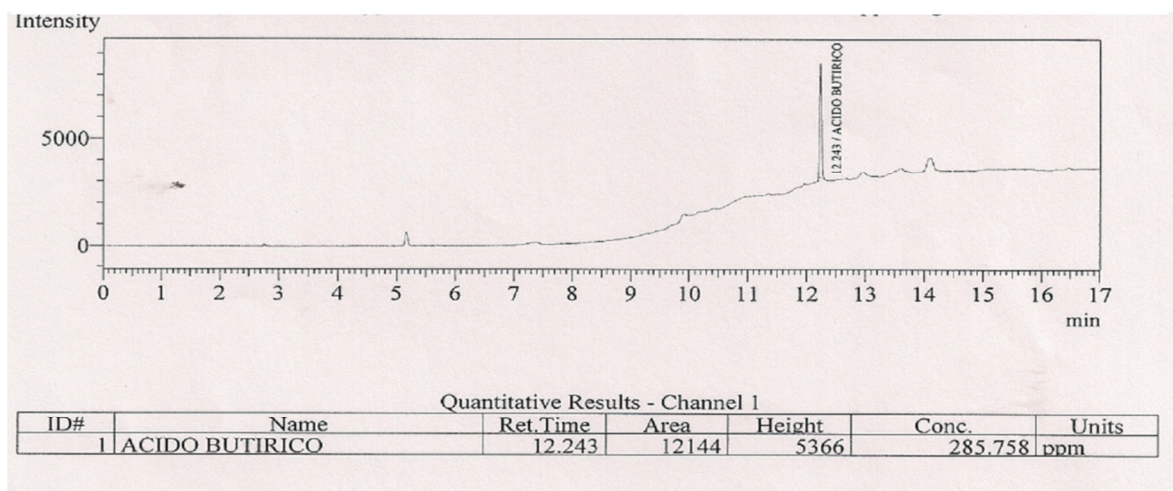
➤ Método Individual de Ácido Propiónico

Figura 19. Cromatograma de un patrón de 300ppm de Ácido Propiónico



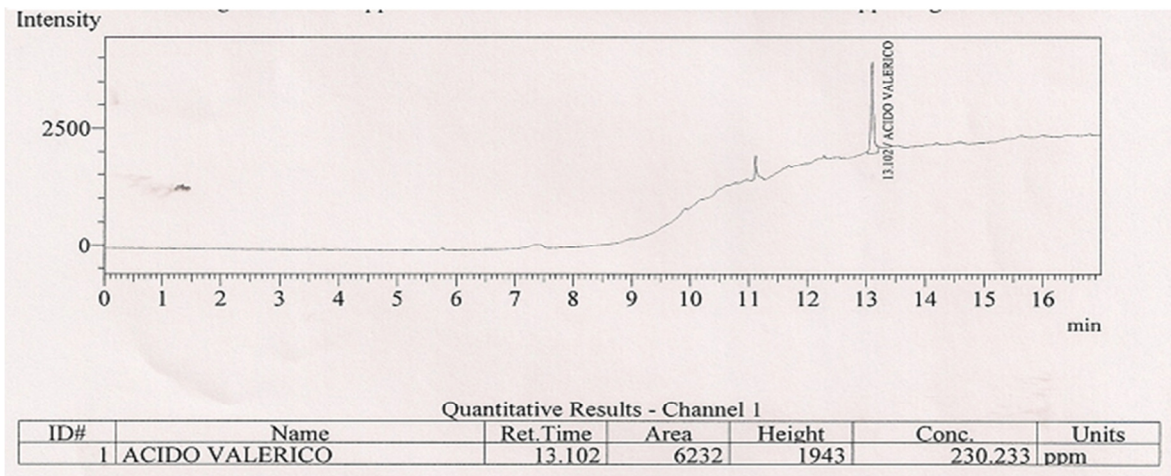
➤ Método Individual de Ácido Butírico

Figura 20. Cromatograma de 300ppm de Ácido Butírico



➤ Método Individual de Ácido Valérico

Figura 21. Cromatograma de un patrón de 250ppm de Ácido Valérico



6.2 CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DEL PROCESO

➤ Método de Bajas concentraciones

Figura 22. Cromatograma de una muestra de Miel B

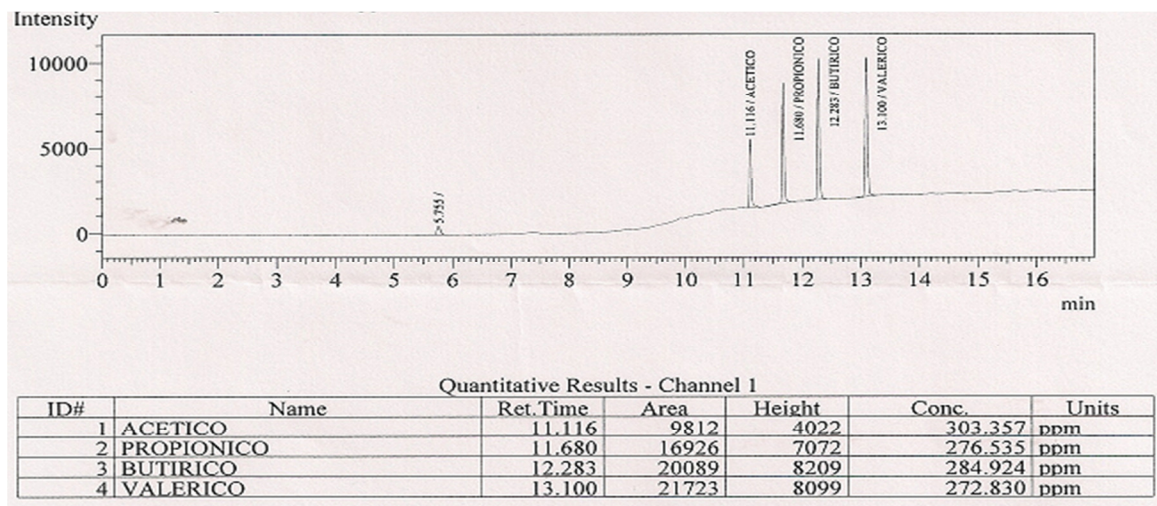
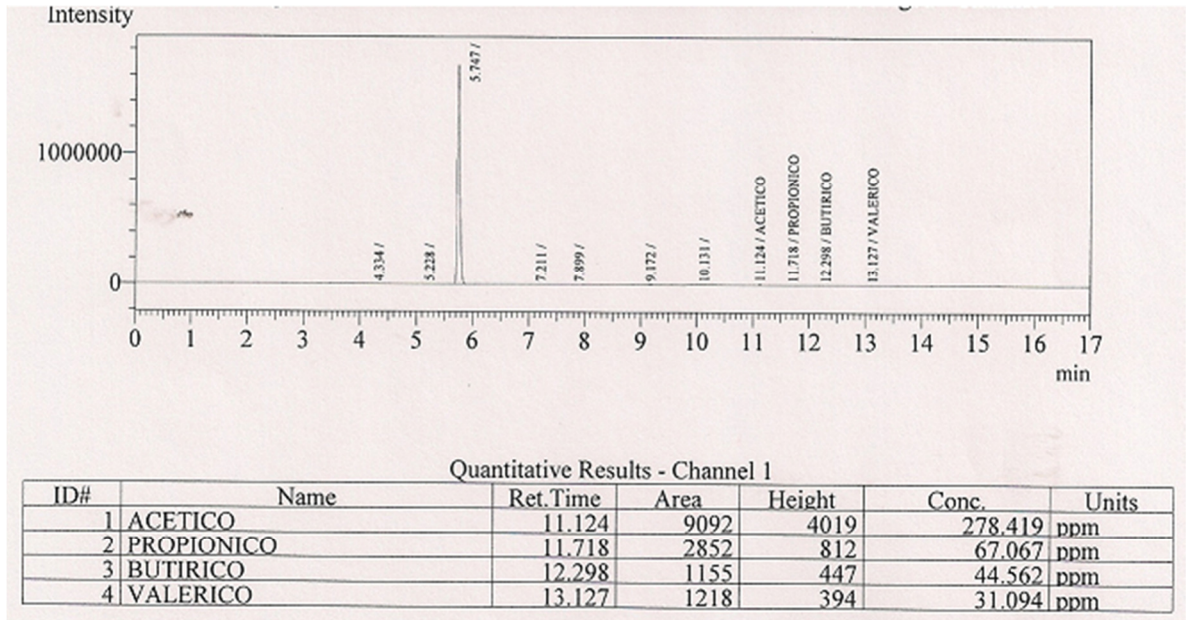
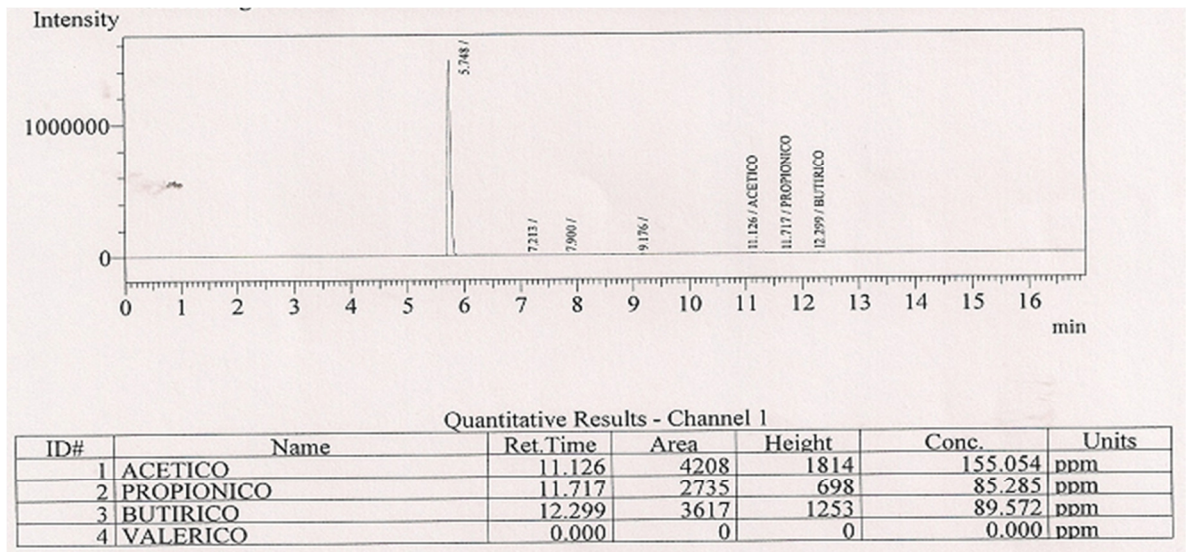


Figura 23. Cromatograma de una muestra de Mezcla



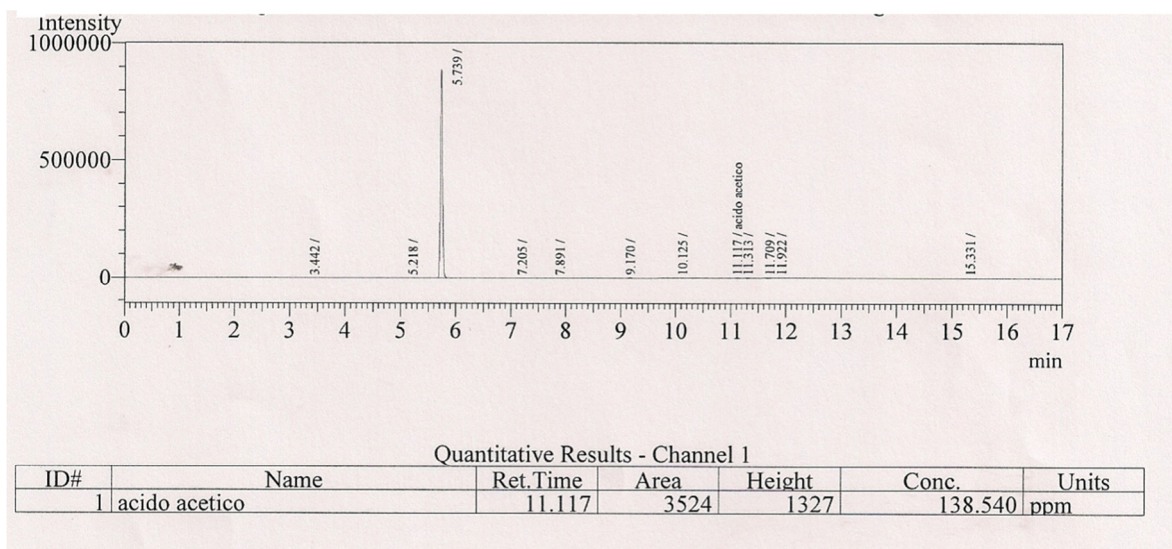
➤ **Método de Altas concentraciones**

Figura 24. Cromatograma de una muestra del tanque de vino 335



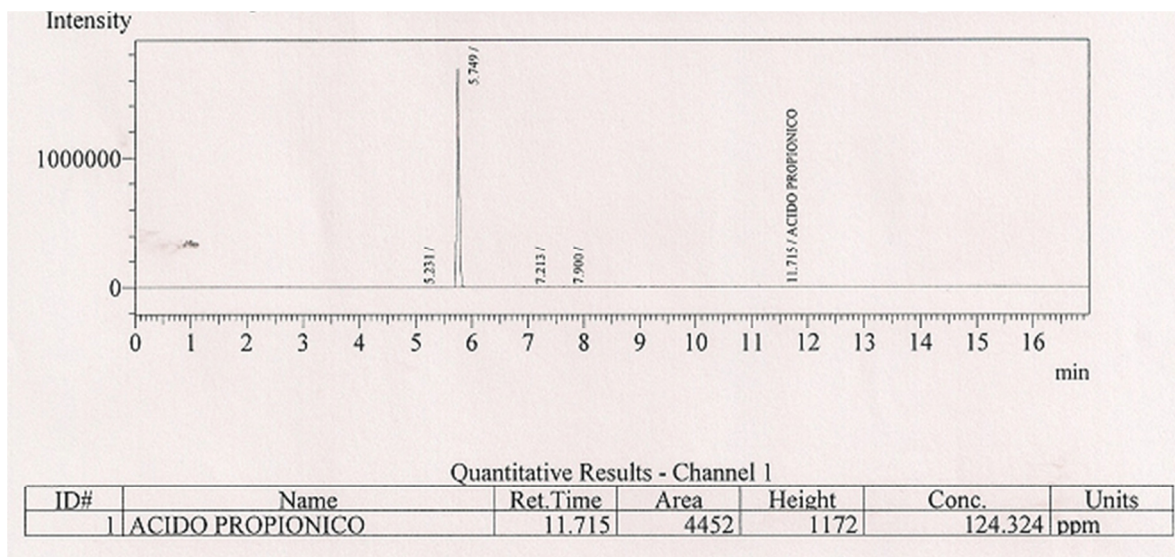
➤ Método Individual de Ácido Acético

Figura 25. Cromatograma del fermentador R-312



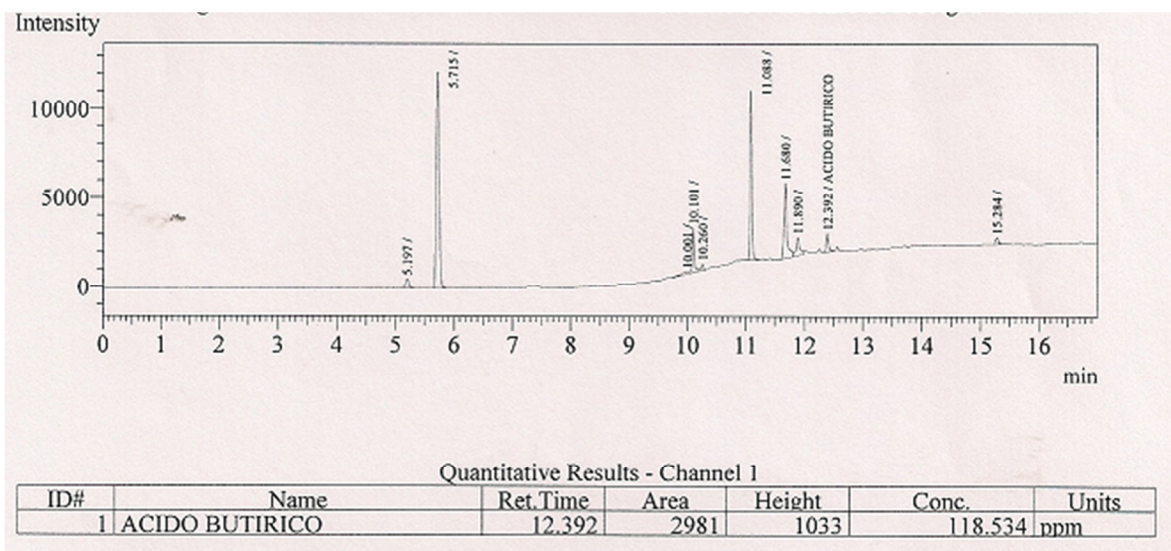
➤ Método Individual de Ácido propiónico

Figura 26. Cromatograma de una muestra del fermentador R-312



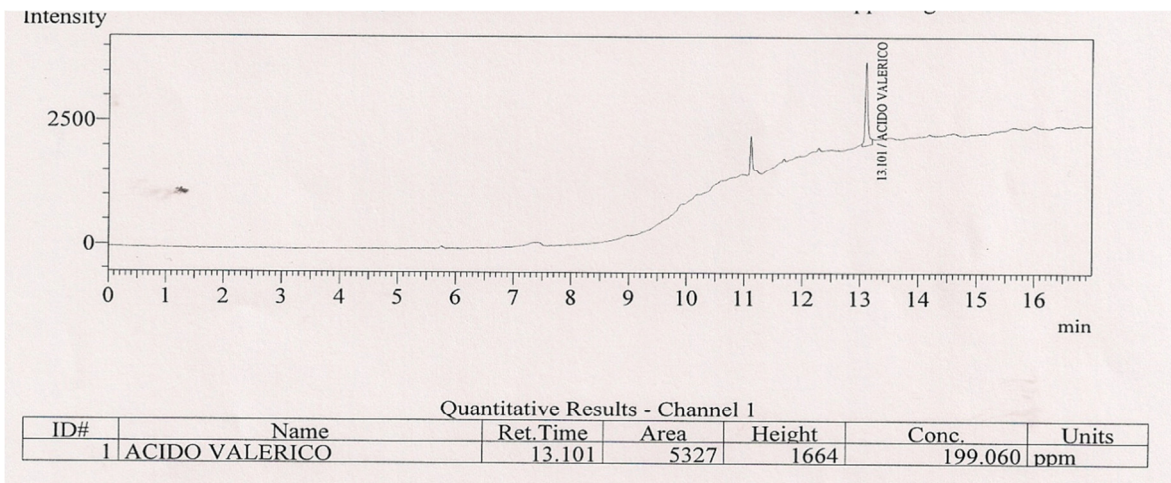
➤ Método Individual de Ácido Butírico

Figura 27. Cromatograma de una muestra del fermentador R-311



➤ Método Individual de Ácido Valérico

Figura 28. Cromatograma de una muestra de Miel B

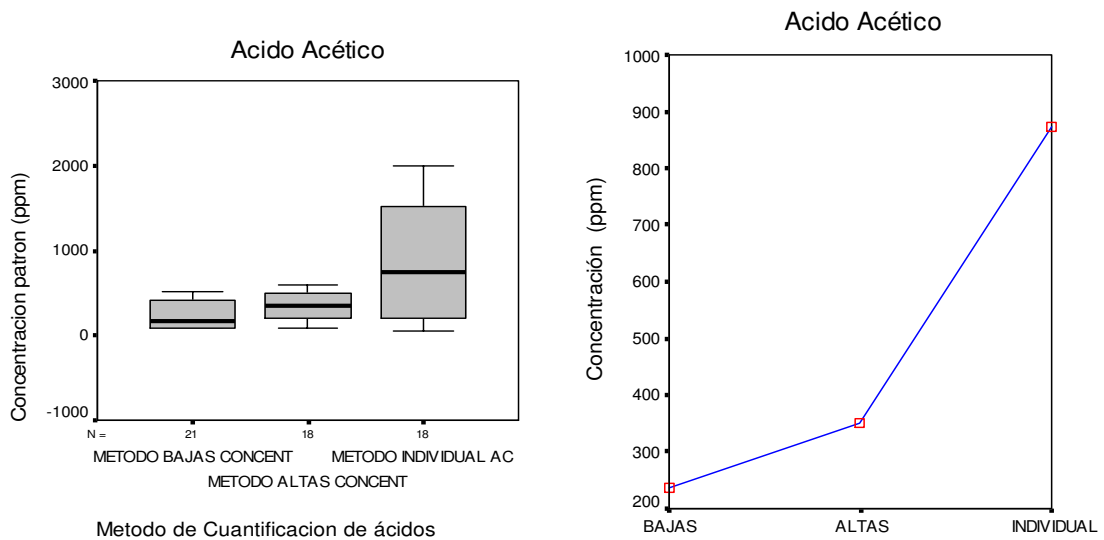


6.3 Análisis Estadístico para Métodos de Cuantificación

Para comparar los tres métodos de cuantificación de ácidos orgánicos volátiles se usó la metodología del análisis de varianza de una vía. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS para Windows. Para evaluar las condiciones de variación de acidez volátil producida por los AOV y comparar la cuantificación de los ácidos orgánicos volátiles por método entre las jornadas de mañana y tarde, se llevaron a cabo pruebas t-Student para dos medias independientes. En el Anexo 2 se registran los datos del valor p (sig.) ANOVA definido como la probabilidad de obtener un resultado, al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido para los ácidos acético, propiónico, butírico y valérico respectivamente de AOV en los métodos cromatográficos.

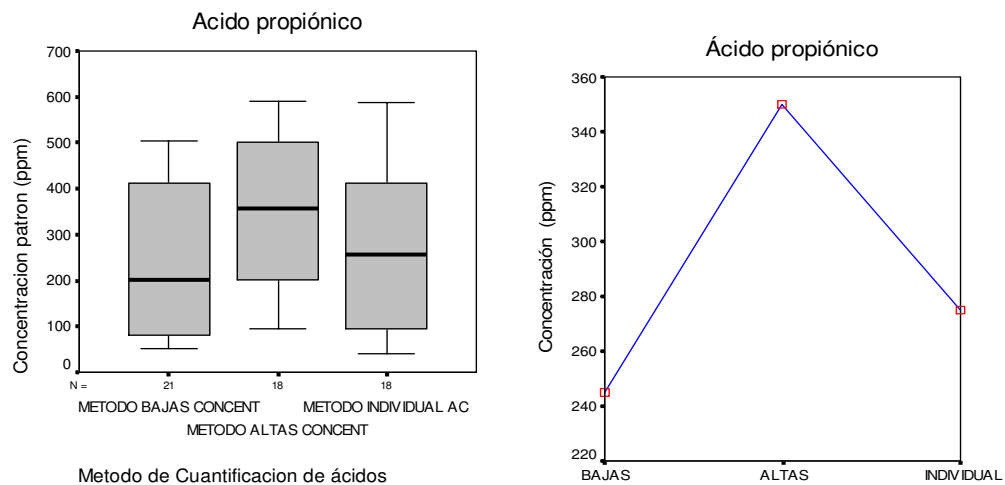
En las figuras 29 a 32 se registran los diagramas de líneas comparativas entre las medianas de los diferentes métodos de cuantificación, para cada uno de los ácidos. Para el ácido acético se observa empíricamente que el método individual difiere en cuantificación de AOV en el proceso fermentativo a los otros dos métodos.

Figura 29. Diagrama comparativo de líneas y de cajas de la cuantificación de ácido acético en los métodos cromatográficos bajas concentraciones, altas e individual



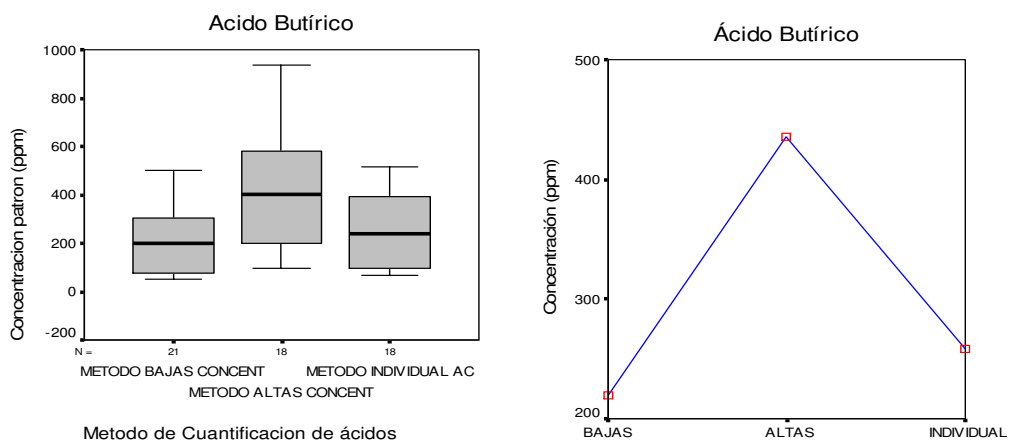
En la figura 30 para el ácido propiónico se observan similitudes entre los métodos bajas concentraciones e individual en relación con el método de altas concentraciones, el cual presenta diferencias de cuantificación de AOV.

Figura 30. Diagramas comparativos de líneas y de cajas de la cuantificación de ácido propiónico en los métodos cromatográficos bajas concentraciones, altas e individual



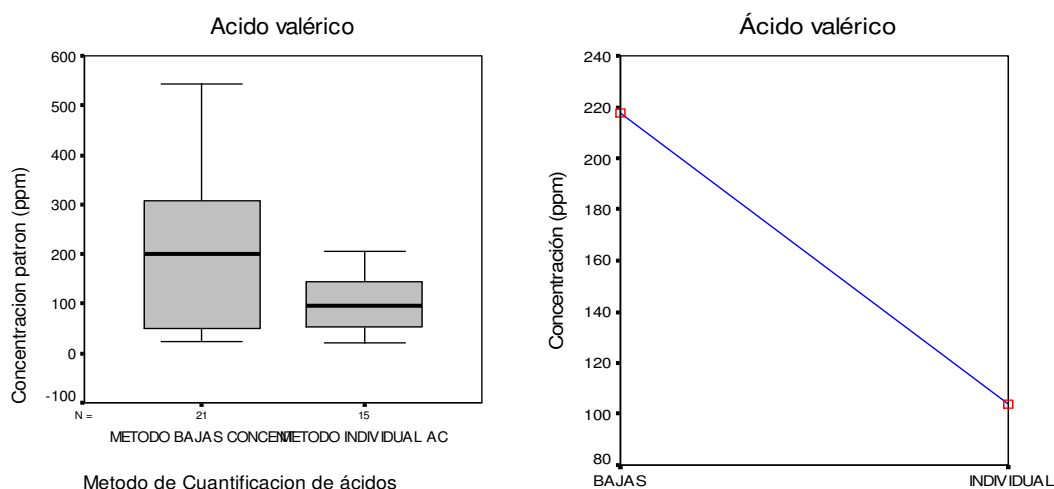
En la figura 31 para el ácido butírico se observan las diferencias de cuantificación de AOV entre el método de altas concentraciones con los otros métodos.

Figura 31. Diagramas comparativos de líneas y de cajas de la cuantificación de ácido butírico en los métodos cromatográficos bajas concentraciones, altas e individual



En la figura 32 se observa la comparación de los métodos cromatográficos para el ácido valérico notándose diferencias entre las medianas y una gran dispersión de datos en el método de bajas concentraciones en comparación con el método individual, lo que nos lleva a pensar que hay variabilidad en la cuantificación de ácido valérico en los métodos cromatográficos.

Figura 32. Diagramas comparativos de líneas y de cajas de la cuantificación de ácido valérico en los métodos cromatográficos bajas concentraciones e individual



6.4 Prueba de tukey de comparaciones múltiples en métodos

➤ Ácido acético

En la comparación de métodos se aplicó la prueba de Tukey de comparaciones múltiples (Anexo 3), en esta prueba no se encontraron diferencias en la cuantificación de ácido acético entre los métodos de bajas y altas concentraciones ($p=0,690$), pero si entre los métodos altas-individual con un $p=0,002$ y bajas-individual ($p<0,001$) detectándose una diferencia estadísticamente significativa en la cuantificación de ácido acético entre estos métodos.

➤ **Ácido propiónico**

En la prueba de Tukey de comparaciones múltiples para el ácido propiónico (Anexo 4) no se encuentran diferencias de cuantificación entre ninguno de los métodos cromatográficos, ya que se obtienen ($p > 0,05$) por lo tanto no es rechazada la hipótesis de igualdad.

➤ **Ácido butírico**

Al realizar la prueba de Tukey de comparaciones múltiples (Anexo 5) no se encontraron diferencias en la cuantificación de ácido butírico entre el método de bajas concentraciones e individual ($p = 0,826$), pero si entre los métodos de concentraciones altas-individual ($p = 0,032$) y entre bajas y altas concentraciones ($p = 0,005$).

➤ **Ácido valérico**

Para el ácido valérico no se realiza un análisis de comparaciones múltiples debido a que se encuentra en muy baja concentración en todas las muestras y por lo tanto se excluye del método de altas concentraciones.

Dado el incumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la realización de la comparación de métodos de cuantificación se registran los datos (Anexo 6).

En la tabla 10 se resumen los valores obtenidos de la Prueba de Shapiro-Wilk para métodos en los que se presenta el valor_p registrado para cada uno de en los distintos métodos cromatográficos donde se observan diferencias absolutas poco significativas en las diferencias de cuantificación entre métodos y datos de valor_p menores al 5% corroborando el incumplimiento de los supuestos de normalidad en su gran mayoría para los métodos cromatográficos.

Tabla 10. Normalidad de la Prueba de Shapiro-Wilk para los AOV en métodos

ÁCIDOS ORGÁNICOS VOLÁTILES	MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN	PRUEBA DE SHAPIRO-WILK
ACÉTICO	Altas	NO
	Bajas	SI
	Individual	NO
PROPIÓNICO	Altas	NO
	Bajas	SI
	Individual	SI
BUTÍRICO	Altas	NO
	Bajas	NO
	Individual	NO
VALÉRICO	Bajas	NO
	Individual	SI

Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los métodos cromatográficos, la cual es una prueba no paramétrica adecuada para detectar diferencias en la localización de las distribuciones entre los grupos o tratamientos, la cual no asume que la distribución subyacente es normal, pero asume que las formas de las distribuciones son las mismas (asimétricas) en los diferentes grupos, y que la única diferencia posible está en las localizaciones.

Los resultados reportados en la tabla 11 revelan para ácido acético como para ácido valérico que hay evidencia estadística ($p < 0,05$) para afirmar que hay diferencias en las concentraciones medias de ácido acético entre los métodos cromatográficos, mientras que para ácido propiónico revelan ($p > 0,05$), por lo tanto no hay diferencias en las medias de las concentraciones para este ácido, lo que nos indica que la cuantificación parece ser similar en los tres métodos cromatográficos. Iguales resultados se obtuvieron para ácido butírico en los métodos cromatográficos.

Tabla 11. Resumen prueba de kruskal-Wallis de AOV en Métodos

ÁCIDOS ORGÁNICOS VOLÁTILES	Sig. ASINTÓTICO
ACÉTICO	0,014
PROPIÓNICO	0,179
BUTÍRICO	0,020
VALÉRICO	0,030

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MUESTRAS POR JORNADAS

7.1 Análisis Estadístico para comparación entre Jornadas

Para la evaluación de las posibles diferencias entre jornadas se realizaron pruebas t-student de comparación de dos medias para muestras independientes. En general, no se cumplieron los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas para la realización de estas pruebas (Anexo 7).

➤ **Ácido acético**

La tabla 12 muestra los resultados de la prueba de kolmogorov-Smirnov para el ácido acético en el método de altas concentraciones con una diferencia absoluta de 0,131 y ($p>0,05$) con lo cual podemos inferir que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre jornadas. Este resultado estadístico podría sugerir que no se vería afectado el proceso fermentativo.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para el ácido acético en el método de bajas concentraciones (tabla 12) revela ($p>0,05$) y una diferencia absoluta de 0,214ppm lo que indica que no hay evidencia estadísticamente significativa para acético entre las jornadas en el método de bajas concentraciones.

Para el ácido acético ($p>0,05$) y la diferencia absoluta (0,286) en el método individual (tabla 12) no revela diferencia estadísticamente significativa y la variabilidad de las distribuciones en las concentraciones es similar para las jornadas de mañana y tarde.

➤ **Ácido propiónico**

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para el ácido propiónico en la tabla 12 en el método de altas concentraciones resultó ($p>0,05$) con lo que podemos inferir que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre jornadas para el

ácido propiónico. Se estimó una pequeña diferencia absoluta entre jornadas de 0,214ppm, lo que corrobora la hipótesis de igualdad en mañana y tarde.

En el método de bajas concentraciones para el ácido propiónico en la tabla 12 ($p>0,05$) y diferencia absoluta de 0,214ppm lo que indica que no hay evidencia estadísticamente significativa entre jornadas.

Para ácido propiónico en el método individual ($p>0,05$) y diferencia absoluta (0,286ppm) (tabla 12), no registra diferencia estadísticamente significativa y la variabilidad de las distribuciones en las concentraciones, por lo tanto hay similitudes entre jornadas.

➤ **Ácido butírico**

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para ácido butírico (tabla12) en los tres métodos revela ($p>0,05$) con lo cual podemos inferir que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre jornadas para este ácido en bajas concentraciones, altas e individual. Se estimaron pequeñas diferencias absolutas de 0,167; 0,241 y 0,500ppm, valores que no afectan significativamente la cuantificación por jornadas de ácido butírico.

➤ **Ácido valérico**

El ácido valérico en bajas concentraciones y en individual según la tabla 12 nos muestra ($p>0,05$) en ambos métodos y diferencias absolutas de 0,214 y 0,250ppm por lo tanto no se rechaza la hipótesis de igualdad para este ácido en jornadas.

Tabla 12. Resumen Prueba de Kolmogorov-Smirnov (Jornadas)

ÁCIDOS OR- GÁNICOS	METODO CROMATOGRÁFICO	DIFERENCIA ABSOLUTA	Sig. ASINTÓTICO
ACÉTICO	Altas	0,131	1,000
	Bajas	0,214	0,905
	Individual	0,286	0,938
		0,214	0,928
PROPIÓNICO	Altas		
	Bajas	0,214	0,905
	Individual	0,262	0,980
		0,167	0,994
BUTÍRICO	Altas		
	Bajas	0,214	0,905
	Individual	0,500	0,635
		-----	----
VALÉRICO	Altas		
	Bajas	0,214	0,905
	Individual	0,250	1,000

La tabla 13 registra un resumen básico de valores estadísticos de AOV para los métodos cromatográficos.

Tabla 13. Estadísticos descriptivos de los métodos cromatográficos de cuantificación de AOV

ÁCIDOS	MÉTODO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACIÓN TÍPICA	MINIMO (ppm)	MÁXIMO (ppm)	RANGO PROMEDIO (ppm)
ACÉTICO	Altas	350,22	357,04	175,51	93,65	591,24	30,42
	Bajas	237,47	163,36	160,09	83,53	507,02	21,21
	Individual	871,67	747,50	718,54	49,46	2002,02	36,67
PROPIÓNICO	Altas	350,22	357,04	175,51	93,65	591,24	36,64
	Bajas	244,89	200,22	159,94	52,30	503,97	24,83
	Individual	274,98	257,38	191,66	40,41	588,04	28,22
BUTÍRICO	Altas	435,41	401,03	285,40	94,31	935,78	37,75
	Bajas	219,65	198,31	143,45	50,31	500,29	23,21
	Individual	258,41	241,15	163,66	64,97	516,91	27,00
VALÉRICO	Bajas	217,64	200,53	164,27	23,02	545,01	21,71
	Individual	103,94	96,10	67,39	21,90	206,61	14,00

8. CONCLUSIONES

- La técnica de cromatografía de gases implementada y estandarizada es adecuada para la determinación de ácidos orgánicos volátiles en todo el proceso fermentativo en la destilería del Ingenio Mayagüez S.A ya que cumple con los parámetros establecidos de linealidad, repetibilidad, exactitud y reproducibilidad siendo un método confiable y preciso.
- En el método desarrollado para evaluar altas concentraciones de AOV, el ácido que presentó una mayor concentración fue el ácido butírico con un máximo de 935,78ppm. En el método de bajas concentraciones la mayor concentración fue para el ácido valérico con un máximo de 545,01ppm y un mínimo de concentración de 23,02ppm y en el método individual se halló la mayor concentración de ácido acético con 2002,02ppm y un mínimo de 49,46ppm.
- la más baja concentración detectada a 21.90ppm fue el ácido valérico por el método individual seguido por el método de bajas concentraciones con 23,02ppm.
- Según el análisis estadístico realizado a los métodos por jornadas para cada uno de los AOV, se encontró que no se presentan diferencias absolutas significativas, con lo cual se puede asegurar que es un buen método para conocer los niveles de AOV que permita implementar controles en el proceso fermentativo.
- Las mayores diferencias encontradas de desviación de los datos en su distribución, en los métodos cromatográficos para AOV fueron para ácido acético en el método individual y para el ácido propiónico y butírico en el método de altas concentraciones, encontrándose valores mayores en las características de concentración.
- De la Investigación se puede establecer que los tres métodos cromatográficos implementados dependiendo el tipo de muestra son muy acertados en la cuantificación de los AOV debido a las diferencias de concentración ha-

lladas a través de todos los análisis realizados en las diferentes muestras en las etapas del proceso fermentativo.

9. RECOMENDACIONES

- Es posible establecer convenios interinstitucionales que permitan una mejor y mayor interacción entre la Universidad y el sector productivo, entre la academia y la investigación en la aplicación de los métodos estadísticos para la experimentación y el mejoramiento de la calidad, que propendan por el bienestar de la comunidad y el país.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. ESCALANTE, P., IBARRA, V. 2007. Los Cultivos Mixtos y las Fermentaciones Alcohólicas. División de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima. 1-10p.
2. CALDERON, N. 2007. Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico. Trabajo de Grado (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. 25-27p, 38-41p, 40-43p.
3. FAJARDO, E., SARMIENTO, S. 2007. Evaluación de Melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces Cerevisiae*. Trabajo de Grado (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. 21-22p, 31-32p.
4. ACEVEDO, B., RICCIARDI, G., DELLACASSA, E., AVANZA, J. 2006. Componentes Volátiles del aceite esencial de Lima Rangpur. Trabajo de Grado. Universidad Nacional del Nordeste. 1-5p.
5. CASTILLO, J. 2008. Determinación de la velocidad lineal y flujo óptimos de una columna Cromatográfica empleando las curvas de Van Deemter. Laboratorio de análisis instrumental. 1-4p.
6. CHAVES, M. 2003. Producción de alcohol Carburante (Etanol) en Costa Rica: Consideraciones sobre su potencial real de uso. Dirección de Investigación y Extensión de la caña de azúcar (DIECA). 1-2p.
7. EGUCHI, S., YOKOYA, F., PRADA, G., UMINO, C., CASTRO, M. 1995. Usinas de Açúcar e Álcool: Estudo das leveduras e dos fatores que afetam a fermentação. Fundação Tropical de Pesquisas e tecnologia "André Tosello" campinas, SP. 12-15p.

8. SEOP CHANG, I., HONG KIM, B. KYIUN SHIN, PYONG. 1996. Use of Sulfito and Hydrogen Peroxide to Control Bacterial Contamination in Ethanol fermentation. Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Sungpook-ku, Seoul 136-791, Korea. 1-5p.
9. MORA, O. 2009. Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas y levaduras nativas presentes en la planta de etanol del Ingenio Mayagüez S.A y evaluación de sustancias biocidas para su control. Trabajo de Grado (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Santafé de Bogotá. 33-49p.
10. PALACIOS, A., SANTIAGO, L., MACIAS, C., RASINES, G., NAVASCUES, E., RODRIGUEZ, P. 2002. Influencia de los Micronutrientes en la fermentación alcohólica de las levaduras tipo *Saccharomyces Cerevisiae* CEG. Universidad de la Rioja. Volumen 37, número 2912. 1-4p.
11. QUINN, G., KEOUGH, M. J. 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. CAMBRIDGE. New York. 47-48p.
12. BARRETO, G., VIERA, R., GUEVARA, G., RODRÍGUEZ, C., ESTÉVEZ, J., PEDRAZA, R., BARRETO, S., VILA, M., OLAZÁBAL, R., GALVES, M., MARTÍNEZ, S., SOTO, S., SANCHEZ, M., VÉLIZ, M. 2006. Centro de Estudio para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA) en la ganadería del territorio. Universidad de Camagüey. Volumen 18, número 2. 1-3p.
13. ALVAREZ, P. 2007. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces Cerevisiae*. Eventos Turciencia de ciudad de la habana. Trabajo de grado (Microbióloga Industrial). Universidad de la Habana. 20-30p.
14. NELSON, D., COX, M. 2004. Glycolysis, Gluconeogenesis and the Pentose Phosphate Pathway. Lehninger's Principles of Biochemistry. W.H.Freeman. 70-74p.

15. WILHELM, R. 2002. Carboxylic Acids, Aliphatic in Ullmann's. Encyclopedia of Industrial Chemistry. 87-90p.
16. DESAUZIERS, V., AVEZAC, M., FANLO, J. 2000. Simple analysis of odorous fatty acids in distillery effluents by capillary electrophoresis. Analisis. Volume 28. France. 165-167p.
17. SKOOG, D., HOLLER, J., NIEMAN, T. 2001. Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. Mc GRAW-HILL. Madrid. 76-78p.
18. CASELLA, J. 2008. Statical Design. SPRINGER. New York. 245-247p.
19. MONTGOMERY, D. 2004. Diseño y Análisis de Experimentos. Universidad estatal de Arizona. Editorial Limusa, S.A de C.V. México. 96-97p.
20. VOSS, D; DEAN, A. 1999. Design and Analysis of Experiments. Ohio State University. SPRINGER. New York. 48-51p.
21. SPSS. Versión 11.5 para Widows

Anexo 1

Datos Curva de Van Deemter

FLUJOS (mL/min)	1.61		1.71		1.81		1.91		2.01	
MEDIA TM	3.213		3.0866667		2.954333		2.845333		2.754	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	4.44089E-16		0.0004714		0.0017		0.000471		0	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA	1.38216E-14		0.01527228		0.057532		0.016568		0	
ANCHO DE BANDA	13.863	13.599	13.618	13.427	13.412	13.192	13.254	13.005	13.072	12.859
	13.886	13.618	13.621	13.428	13.41	13.191	13.251	13.007	13.079	12.861
	13.882	13.619	13.621	13.426	13.413	13.202	13.251	13.006	13.079	12.856
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA MEDIA	0.270363042		0.19705408		0.226666		0.251363		0.228135	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	0.259636958		0.18894592		0.206668		0.240637		0.207865	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	13.73433333		13.505		13.286		13.09833		12.94233	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	0.000471405		0		0.001414		0.000471		0.001247	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	0.003432307		0		0.010644		0.003599		0.009637	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	13.73550365		13.505		13.28951		13.0995		12.94543	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	13.73316302		13.505		13.28249		13.09716		12.93924	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	112822.9667		111715.833		113588.6		114733.7		114638.9	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	819.9963916		651.353823		1696.222		1220.327		476.9494	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	0.726799176		0.58304522		1.493302		1.063617		0.416045	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	114858.6948		113332.888		117799.7		117763.3		115823	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	13.73316302		13.505		13.28249		13.09716		12.93924	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	42977.72294		78341.9797		60162.28		45360.92		56393.9	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	0.116339342		0.07658729		0.09973		0.132272		0.106394	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	1556.178027		1943.84449		2030.915		2108.716		2178.649	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	0.90303	0.8882	0.94547	0.88821	0.98593	0.8882	1.02738	0.8882	1.06686	0.8882
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	1.79124		1.83368		1.87414		1.91559		1.95507	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	1.15278		1.15278		1.15278		1.15278		1.15278	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	1.553843752		1.5906591		1.625757		1.661713		1.695961	
DESVIACIÓN ESTANDAR D.E.R.	0.77104554		0.75885536		0.747533		0.736228		0.725729	
INTERVALO DE CONFIANZA INTERVALO DE CONFIANZA PROMEDIO AREA	0.576218031		0.73132447		0.775655		0.817736		0.857078	

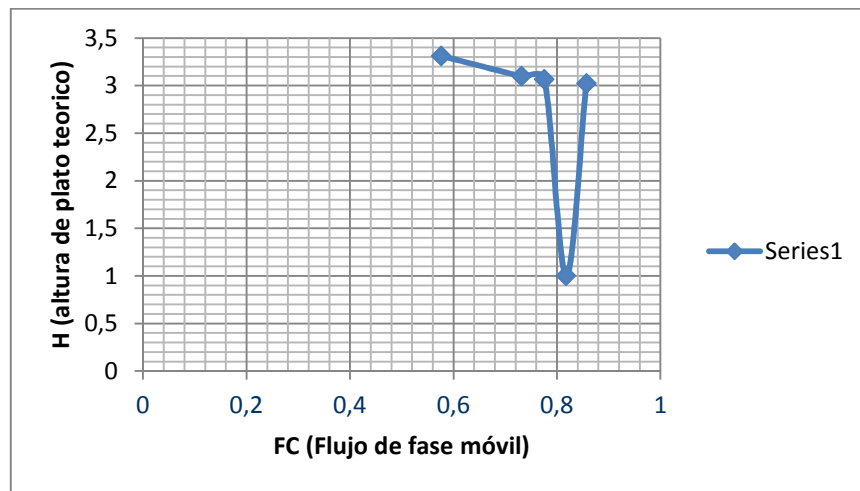
$H=A+B/Fc+C*Fc$	3.311672228	3.09870659	3.064888	1	3.023833
-----------------	-------------	------------	----------	---	----------

Continuación Anexo 1

Datos para graficar la curva de Van Deemter

Hexp	FLUJO FASE MÓVIL	Hcorr	FlujoExp
0.116339342	0.576218031	3.31167223	1.61
0.076587291	0.731324468	3.09870659	1.71
0.099730266	0.775655323	3.06488776	1.81
0.132272452	0.817736038	1	1.91
0.106394479	0.857077783	3.02383303	2.01

Curva de Van Deemter



El flujo de fase móvil hallado en el que la eficiencia de la columna será óptimo con la curva de Van Deemter es 0.817736038.

Anexo 2

ANOVA en los tres métodos

Ácido acético

Concentración (ppm)	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4297172,854	2	2148586,427	11,823	,000
Intra-grupos	9813281,839	54	181727,441		
Total	14110454,693	56			

Ácido propiónico

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	111737,957	2	55868,978	1,818	,172
Intra-grupos	1659789,817	54	30736,848		
Total	1771527,774	56			

Ácido butírico

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	496780,328	2	248390,164	5,957	,005
Intra-grupos	2251648,528	54	41697,195		
Total	2748428,855	56			

Ácido valérico

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	113120,130	1	113120,130	6,376	,016
Intra-grupos	603245,899	34	17742,526		
Total	716366,029	35			

Anexo 3

Tratamiento estadístico para el ácido acético. Prueba de Tukey de Comparaciones múltiples

Método de Cuantificación de ácidos (I)	Método de Cuantificación de ácidos (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
METODO BAJAS CONCENTRACIONES ACIDOS	ALTAS CONCENTRACIONES	-112,7409	136,92939	,690	-442,7385	217,2567
	INDIVIDUAL	-634,1964(*)	136,92939	,000	-964,1940	-304,1988
METODO ALTAS CONCENTRACIONES ACIDOS	BAJAS CONCENTRACIONES	112,7409	136,92939	,690	-217,2567	442,7385
	INDIVIDUAL	-521,4556(*)	142,09834	,002	-863,9103	-179,0008
METODO INDIVIDUAL ACIDOS	BAJAS CONCENTRACIONES	634,1964(*)	136,92939	,000	304,1988	964,1940
	ALTAS CONCENTRACIONES	521,4556(*)	142,09834	,002	179,0008	863,9103

Anexo 4

Tratamiento estadístico para el ácido propiónico. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples

Método de Cuantificación de ácidos (I)	Método de Cuantificación de ácidos (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
METODO BAJAS CONCENTRACIONES ACIDOS	ALTAS CONCENTRACIONES	-105,3209	56,31396	,157	-241,0366	30,3949
	INDIVIDUAL	-30,0853	56,31396	,855	-165,8011	105,6304
METODO ALTAS CONCENTRACIONES ACIDOS	BAJAS CONCENTRACIONES	105,3209	56,31396	,157	-30,3949	241,0366
	INDIVIDUAL	75,2356	58,43976	,408	-65,6033	216,0744
METODO INDIVIDUAL ACIDOS	BAJAS CONCENTRACIONES	30,0853	56,31396	,855	-105,6304	165,8011
	ALTAS CONCENTRACIONES	-75,2356	58,43976	,408	-216,0744	65,6033

Anexo 5

Tratamiento estadístico para el ácido butírico. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples

Método de Cuantificación de ácidos (I)	Método de Cuantificación de ácidos (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
METODO BAJAS CONCENTRACIONES	ALTAS CONCENTRACIONES	-215,7625(*)	65,59033	,005	-373,8342	-57,6909
	INDIVIDUAL	-38,7542	65,59033	,826	-196,8258	119,3174
METODO ALTAS CONCENTRACIONES	BAJAS CONCENTRACIONES	215,7625(*)	65,59033	,005	57,6909	373,8342
	INDIVIDUAL	177,0083(*)	68,06630	,032	12,9696	341,0470
METODO INDIVIDUAL	BAJAS CONCENTRACIONES	38,7542	65,59033	,826	-119,3174	196,8258
	ALTAS CONCENTRACIONES	-177,0083(*)	68,06630	,032	-341,0470	-12,9696

Anexo 6

Homogeneidad de Varianzas y Normalidad Métodos

ÁCIDOS OR- GÁNICOS	HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS	METODO CROMATOGRÁFICO	NORMALIDAD (shapiro wilk)
ACÉTICO	0,000	Altas	0,001
		Bajas	0,105
		Individual	0,024
PROPIÓNICO	0,728	Altas	0,025
		Bajas	0,105
		Individual	0,065
BUTÍRICO	0,003	Altas	0,021
		Bajas	0,039
		Individual	0,040
VALÉRICO	0,012	Bajas	0,035
		Individual	0,078
		---	---

Anexo 7

Normalidad y Homogeneidad de Varianzas Jornadas

ÁCIDOS ORGÁNICOS	METODO CROMATOGRÁFICO	HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS(Levene)	NORMALIDAD (shapiro wilk)	DIFERENCIA DE MEDIAS
ACÉTICO	Bajas-altas	Si	Altas:si	No
	Bajas-individual	No	Bajas:no	Si
	Altas-individual	No	Individual:si	Si
PROPIÓNICO	Bajas-altas	Si	Altas:no	No
	Bajas-individual	Si	Bajas:no	No
	Altas-individual	Si	Individual:no	No
BUTÍRICO	Bajas-altas	No	Altas:no	Si
	Bajas-individual	Si	Bajas:no	No
	Altas-individual	No	Individual:si	Si
VALÉRICO	Bajas-altas	-----	Bajas:no	-----
	Bajas-individual	-----	Individual:no	-----
	Altas-individual	-----	-----	-----