



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA: INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

“ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES”

Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

David Luna

Tutor: Dr. Roman Rodríguez Ph.D.

Ambato, 2012

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Roman Rodríguez.

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación realizado bajo el tema: “ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES”, de la egresado Eduardo David Luna Ortiz; considero que dicho trabajo investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Julio de 2012

.....
Dr. Roman Rodríguez.

TUTOR

AUTORÍA DEL PROYECTO

La responsabilidad del contenido del Proyecto de Investigación, corresponde exclusivamente a Eduardo David Luna Ortiz; Dr. Román Rodríguez, Tutor del trabajo de Investigación **“ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES”**, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Técnica de Ambato.

David Luna

Ambato, Julio de 2012

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Julio de 2012

Para constancia firman:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A mi Anita, por inspirarme con el ejemplo a no rendirme, y si caigo levantarme las veces que sean necesarias, para cumplir las metas, de verdad madre que afortunado que soy por tenerte junto a mí, tu apoyo, comprensión y amor han sido vitales para este proceso.

A mi papi si bien no estás físicamente a mi lado pero tu energía siempre la he sentido, de seguro te hubiera encantado estar acá,

A mis hermanos Fer y Juanjo, incondicionales, ejemplo, y sobre todo paciencia, entre juegos, disputas, y alegrías cada momento junto a ustedes ha sido enriquecedor.

A Liliana, sin ti hubiera sido mucho más difícil, tu comprensión en momentos de tensión y tus consejos siempre los he sabido escuchar, tu paciencia y tu cariño mi mejor inspiración en tiempos de angustia, y emoción en los de alegría.

A Roman, por creer en mí, amigo incondicional, leal, bohemio, loco en un mundo de normales y soñador, tus consejos acertados me han guiado por el camino correcto, enseñándome a ser humano.

A Sofía mi cuñada buena amiga y consejera, y por supuesto a mi sobrino Ariel, la alegría de mis ojos.

A mi familia en general, abuelos , abuelas, tíos, tías, primos, primas, y demás.

A mis amigos, Jacobo, Roberto, Alberto, Cristian, Daniela, Juan Carlos Pérez, Juan Carlos Cáceres, Diana, Gaby, Andrea, Rafaela, Mirari, Arita, Rosalía, pendencieros, luchadores y soñadores, en su momento han sido extremadamente importantes para mí.

A todos los que han aportado en mí, sabiduría y conocimiento, Gracias Totales

David Luna

AGRADECIMIENTO

A mi Madre sin vos muy difícil, hacer esto posible.

A mis hermanos de verdad son grandes en mi vida.

A mis amigos cada uno importante a su manera.

Al Laboratorio de Análisis y control de alimentos, LACONAL, a todo su equipo de trabajo, por el apoyo y facilidad de trabajo.

A la universidad Nacional de Jujuy y su facultad de Ingeniería, el inicio de este trabajo.

A los profesores que trascendieron y fueron más que simple guías.

A la industria Licorera Asociadas ILA, por confiar en este trabajo.

Y a todos los que de una u otra manera creyeron que era posible escribir mi propia historia.

David Luna

Índice

RESUMEN EJECUTIVO	6
--------------------------------	----------

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION	7
1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN	7
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
1.2.1. Contextualización macro, meso y micro.....	8
1.2.2. Análisis Crítico	11
1.2.3. Prognosis.....	12
1.2.4. Formulación del Problema	12
1.2.5. Preguntas directrices	13
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	14
1.4. OBJETIVOS	15
1.4.1. General.....	15
1.4.2. Específicos.....	15

CAPITULO II

MARCO TEORICO	16
----------------------------	-----------

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	16
---	-----------

2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA	31
2.1 FUNDAMENTACIÓN LEGAL.....	32
2.4 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	33
2.4.1 CATEGORIZACIÓN DE VARIABLES.....	33
2.5. HIPÓTESIS	34
2.5.1. Hipótesis de la Investigación	34
2.5.2. Hipótesis Estadística	34
2.5.2.1. Hipótesis Nula.....	34
2.5.2.2. Hipótesis Alternativa.....	34
2.4. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	34

CAPITULO III

METODOLOGIA	35
--------------------------	-----------

3.1. ENFOQUE.....	35
3.2 MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN	35
3.3. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	35
3.4. MÉTODO Y TÉCNICA DE INVESTIGACIÓN	36
3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA	45
3.5.1. Diseño Experimental	45
3.5.1.1. Factores o niveles en estudio para la estandarización de un método analítico para la cuantificación de la concentración de metanol.....	45
3.4.1.2. Tratamientos	46
3.4.2 MUESTRA.....	47
3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	47
3.6. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	48
3.7. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS	49

CAPÍTULO IV

4.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	50
4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	52

CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES..... 53

5.1 CONCLUSIONES:	53
5.2 RECOMENDACIONES.	54

CAPÍTULO VI

PROPUESTA..... 56

6.1 DATOS INFORMATIVOS	56
6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	56
6.3 JUSTIFICACIÓN.....	57
6.4 OBJETIVOS	58
General	58
Específicos	58
6.6 FUNDAMENTACIÓN	59

BIBLIOGRAFÍA..... 63

ANEXOS

ANEXO	A	TABLAS DE RESULTADOS
ANEXO	B	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
ANEXO	C	GRÁFICAS
ANEXO	D	DIAGRAMA

Anexo A

Tablas de resultados

Tabla A-1 Relación de áreas de metanol (A1) con n-butanol (A2) $A1/A2$.

Tabla A-2 Recuperación en porcentaje.

Tabla A-3 Curva de calibración

Tabla A-4 Promedios de la curva de calibración

Tabla A- 5 Grado Alcohólico Brandy FAPAS

Tabla A-6 Relación de Áreas del Material de Referencia

Anexo B

Análisis estadístico.

Tablas del análisis estadístico.

Tabla B-1 Curva de calibración

Tabla B-2 Análisis de varianza para la relación de áreas de la concentración de metanol A1 y n- butanol A2 ($A1/A2$).

Tabla B-3 Análisis de Tukey para diferencias significativas.

Tabla B-4 Límites de confianza

Tabla B-5 Prueba de hipótesis comparación con t de student Día 1.

Tabla B-6 Prueba de hipótesis comparación con t de student Día 2.

Tabla B-7 Prueba de hipótesis comparación con t de student Día 3.

Gráficos del Análisis Estadístico

Gráfico B-1 Factores principales para la relación a1/a2.

Gráfico B-2 Interacciones de la relación de áreas y las concentraciones.

Gráfico B-3 Interacciones de los factores relación a1/a2.

Anexo C

Gráficas

Gráfica C-1 Datos de la curva de calibración de metanol y la relación de áreas Metanol/n-Butanol.

Gráfica C-2 Cromatogramas de Metanol a 0mg/100ml.

Gráfica C-3 Cromatogramas de Metanol a 1,570mg/100ml.

Gráfica C-4 Cromatogramas de Metanol a 3,150mg/100ml.

Gráfica C-5 Cromatogramas de Metanol a 15,74 0mg/100ml.

Gráfica C-6 Cromatogramas de Metanol a 47,210mg/100ml.

Gráfica C-7 Cromatogramas de Metanol a 94,10mg/100ml.

Gráfica C-8 Cromatogramas de Metanol a 149,490mg/100ml.

Gráfica C-9 Cromatogramas de Material referencia Día 1.

Gráfica C-10 Cromatogramas de Material referencia Día 2.

Gráfica C-11 Cromatogramas de Material referencia Día 1

Anexo D

Diagramas

Diagrama D-1 Estandarización del método para la cuantificación de metanol.

RESUMEN EJECUTIVO

El poco o inexistente control de parte de los organismos obligados a llevar un control de calidad en las bebidas alcohólicas de expendio masivo, sumada a la poca capacitación de algunos productores de bebidas alcohólicas, ha generado graves inconvenientes en la salud del consumidor, como se evidencio el mes de agosto del 2011, cuando una intoxicación masiva por causa de metanol quito la vida de alrededor de 50 personas.

Es por ello que el Laboratorio de Análisis y Control de Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato (LACONAL), necesita de un método estandarizado que permita cuantificar el metanol en bebidas alcohólicas, por medio de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización en llama (FID), y de esta forma proporcionar elementos que permitan con facilidad validar el método a futuro, y asegurar la confiabilidad de los resultados.

La estandarización se inició preparando una curva de calibración, utilizando metanol grado cromatográfico, además de n – butanol como estándar interno, para minimizar los errores, porque al ser inyección manual es importante tener cuenta los errores que pueden afectar directamente al método y sus resultados. Para el desarrollo del método fue importante determinar el grado alcohólico, porque para los cálculos respectivos de la concentración de metanol la respuesta debe ser expresada en mg / 100 ml de alcohol anhidro.

En base a los análisis estadísticos, se determino que la curva de calibración está en los parámetros de aceptación para estandarizar el método, por el factor de correlación lineal existente que fue de 0,9993, además los límites de confianza, de cuantificación y detección son aceptables para este método.

El material de referencia Brandy Fapas, fue inyectado en 3 días diferentes con 3 replicas por día, se hizo una comparación estadística entre el resultado referencial y el resultado experimental con un error mínimo y con la aceptación de la hipótesis del método a estandarizar.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Tema de Investigación

“ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES”

1.2. Planteamiento del problema

La industria de bebidas alcohólicas es una de las que más demanda genera a nivel mundial. Cada día aumentan consumidores de bebidas de todo tipo, desde las no destiladas como la cerveza, con bajo contenido alcohólico, hasta las destiladas como el ron, donde el contenido de etanol en concentración de volumen es elevado.

El alto grado de rentabilidad económica que la industria de bebidas alcohólicas genera y el intenso consumo de la población ha provocado que en muchos lugares del mundo se elaboren bebidas alcohólicas de forma casera con alto grado alcohólico y a bajo precio. Esta forma de elaboración, al carecer de estándares de calidad y estar fuera de toda norma establecida, crea una serie de complicaciones técnicas y legales y se convierten en un atentado a la salud y a la vida de las personas que las consumen.

El metanol, por ejemplo, puede ser uno de los contaminantes de la fermentación y destilación, o en algunos casos, producto del desconocimiento, es utilizado como adulterante. La ingestión de alcohol metílico puede provocar daño a la retina, intoxicación crónica e inclusive la muerte, dependiendo del contenido en el producto.

En la actualidad, el poco o casi inexistente control de calidad de las bebidas alcohólicas en el Ecuador, se da por muchos factores, que van desde la inexistencia de un organismo regular de control, la falta de instrumentación en el país, hasta la poca preparación técnica de la gente en la parte operacional de los equipos utilizados para el análisis químico.

Por estos motivos, aprovechando el instrumental existente en el laboratorio de Control y Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la UTA, es necesario validar un método de análisis por cromatografía de gases para la determinación de la concentración de metanol en bebidas alcohólicas, y de esta forma establecer un centro de control de calidad que por un lado brinde información técnica a los productores artesanales e industriales, así como también, permita monitorear la calidad de productos importados.

Aunque muchos productores de alcohol tienen ciertas obligaciones con respecto a la salud pública (por ej. control de calidad, advertencias para la salud), sus metas principales muchas veces se contraponen con ella. De particular preocupación es la globalización del mercado del alcohol, donde las compañías buscan ampliar sus mercados y por consiguiente que haya una mayor disponibilidad y consumo de alcohol. [1]

1.2.1. Contextualización macro, meso y micro.

El consumo de bebidas alcohólicas implica la obtención de grandes ganancias por parte de los productores, los publicistas, y la industria, además de producir importantes ingresos fiscales para los gobiernos. Bebidas como el vino y la cerveza, son considerados como productos agrícolas en países desarrollados y en vías de desarrollo y cumplen un rol importante en la economía de estos países.

Los licores destilados y la cerveza se pueden producir a escala industrial y su reglamentación esta bajo la responsabilidad de los ministerios de salud y de la industria. Es por esto que en algunos casos existen conflictos de intereses para los gobiernos, quienes necesitan las utilidades generadas de las

ventas de las bebidas alcohólicas, pero que también tienen la obligación de cuidar y proteger la salud y bienestar de los consumidores. [1]

En el inicio de la década de los años 60 el consumo mundial de bebidas alcohólicas alcanzaba un promedio de 4 a 6 litros por persona al año, hasta la década de 1980 en donde se estabilizó a un nivel de alrededor de 5 litros por persona al año. En Europa, África y América el consumo de bebidas alcohólicas alcanzó su punto máximo a principios de 1980, Europa es el lugar donde más se consumió comparado con otras regiones llegó hasta los 17 litros por persona al año, llegando a mantenerse en los años 90 en un poco más de 10 litros por persona al año. [2]

En la Figura 1 se presenta un detalle de la media de consumo per cápita en regiones de la OMS.

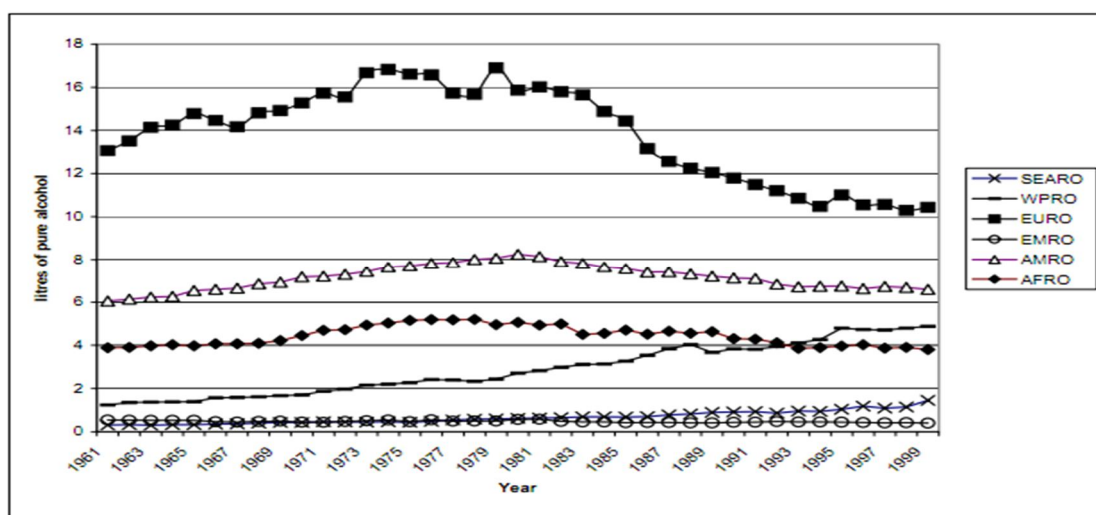


Figura 1: La media de consumo per cápita en regiones de la OMS 1961-1999

América muestra el segundo nivel más alto de consumo, seguida por África y el Pacífico Occidental, en tanto que el Mediterráneo Oriental y el sudeste asiático muestran el nivel más bajo de consumo. En la región de Asia Sudoriental el consumo de bebidas alcohólicas ha aumentado de manera constante mientras que en las regiones del Pacífico Occidental se mantiene estable o decrece en relación con las otras regiones.

Los niveles de consumo de alcohol en todo el mundo tienden a converger, con excepción de la región del Mediterráneo Oriental en donde la mayoría de población es musulmana y el consumo es relativamente bajo. En general el consumo de alcohol sigue aumentando en relación directa con el creciente desarrollo económico. [2]

La gran demanda de las bebidas alcohólicas ha generado que también exista la producción no reglamentada, la misma que va desde la forma casera a la informal o ilícita, situación común en muchos países en vías de desarrollo que genera una fuente de ingresos para familias de escasos recursos por ser alcohol de consumo muy barato.

Este mercado es muchas veces responsable de productos de calidad y seguridad dudosa, o francamente mala, y existen informes de envenenamientos no fatales y fatalidades por bebidas con concentraciones considerables de alcohol metílico y otros aditivos, que pueden ser perjudiciales para la salud,. En México por ejemplo se da el consumo de alcohol etílico con 96 GL (grados Gay Lussac), en Nicaragua se dio una intoxicación masiva por bebidas que tenían metanol que causó más de 40 muertes y todo un rango de secuelas en cientos de personas más. [1]

En el Ecuador a partir del mes de julio del 2011 empezó una intoxicación por bebidas alcohólicas con metanol tanto como adulterante o como producto congénere de la destilación, El Ministerio de Salud confirmó un total de 244 personas intoxicadas de las que 50 personas fallecieron por esta causa. La mayoría de víctimas se dio en la provincia de Los Ríos y la provincia de Tungurahua teniendo 25 y 11 fallecidos respectivamente. [3]

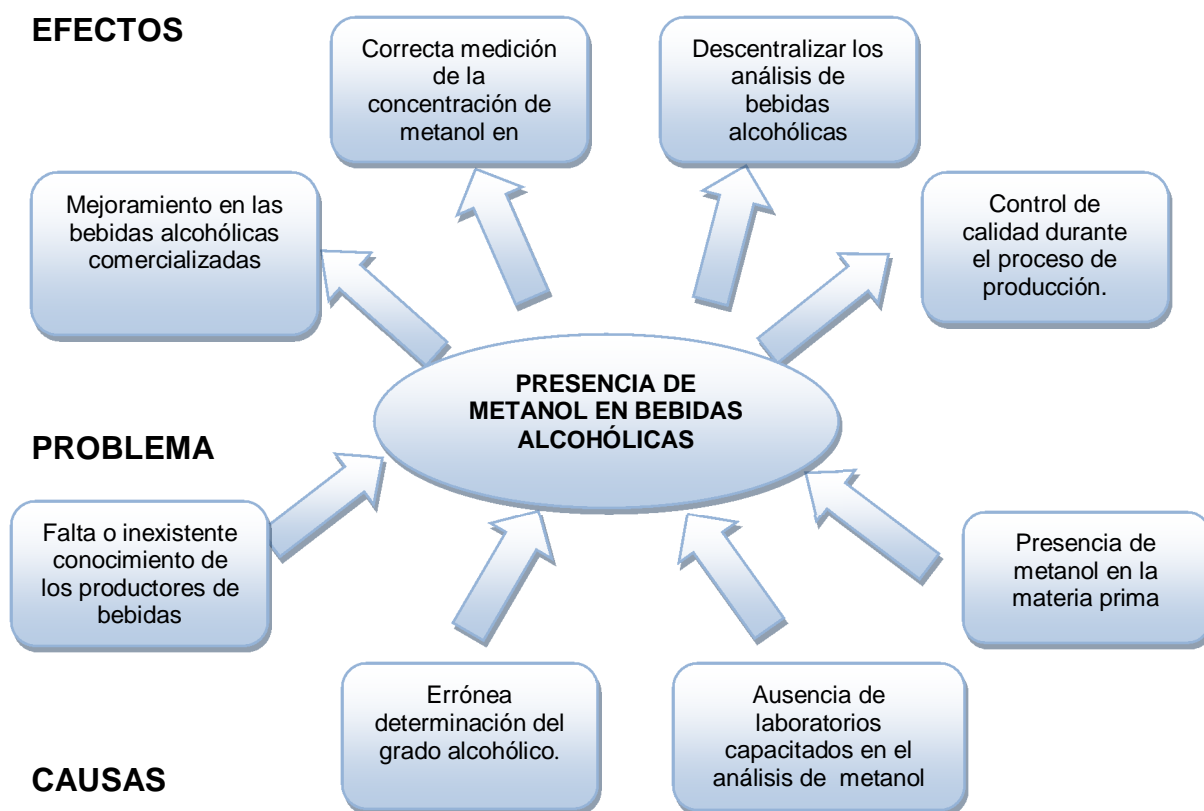
A nivel mundial existen normativas en cada país las que obligan tener un límite máximo permisible de metanol en las distintas bebidas alcohólicas. La mayor parte de los métodos usados en la determinación de metanol se basan en la oxidación a formaldehído y su posterior determinación espectrofotométrica actualmente se cuantifica la concentración utilizando la cromatografía de gases. [4]

En el Ecuador el organismo de control vigente es el Ministerio de Salud Pública con sus distintas direcciones provinciales, y el organismo encargado de expedir un registro sanitario que permita la comercialización de productos alimentarios, farmacéuticos o de ingesta para el ser humano es el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”.

El cuantificar la concentración del metanol por cromatografía de gases en la ciudad de Ambato permitirá tener un control en las industrias productoras de bebidas alcohólicas de la ciudad y la provincia, de esta forma garantizar la calidad a los distintos consumidores.

La validación de métodos analíticos es de mucha importancia en los laboratorios, ya sean de servicio o de investigación, de esta manera se asegura la fiabilidad de sus resultados los mismos que son utilizados en la toma de decisiones según sean los requerimientos.

1.2.2. Análisis Crítico



Árbol de Problemas

Elaborado por: David Luna.

Relación Causa – Efecto

Causa:

Concentración de metanol en bebidas alcohólicas

Efecto:

Validación del método analítico para el control de la calidad de las bebidas alcohólicas.

Para esta investigación se utilizará el cromatógrafo de gases como instrumento de análisis para cuantificar la concentración de metanol existente en las bebidas alcohólicas, este análisis proporcionará información útil sobre la calidad de bebidas alcohólicas que consume la ciudadanía.

1.2.3. Prognosis

La carencia de herramientas en la investigación aplicada para la cuantificación de la concentración de metanol en bebidas alcohólicas como producto congénere o adulterado con alcohol refinado de origen poco confiable, no ha permitido conocer su calidad. La estandarización de parámetros para la validación del método evaluaría de la calidad de los licores garantizando que el producto no tenga componentes que adulteren su composición permitida por las normas vigentes, y así exigir mejoras en su industrialización,

1.2.4. Formulación del Problema

Los métodos para la determinación de la concentración de metanol en bebidas alcohólicas son varios, desde los cualitativos que indican ausencia o presencia, hasta los cuantitativos como la espectrofotometría y la cromatografía de gases. La selección de un método para la cuantificación es bastante esencial para un laboratorio, y se debe seleccionar en función de la sensibilidad del método, para este caso el cromatógrafo de gases presenta mejor sensibilidad de detección además de presentar buenas características como la selectividad, exactitud, precisión, repetitividad, límites de detección y

cuantificación, sensibilidad, linealidad y otros parámetros exigidos por la norma ISO/IEC 17025.

¿La estandarización de parámetros que permitan la validación para la cuantificación de la concentración de metanol en bebidas alcohólicas se realizará utilizando cromatografía de gases?

1.2.5. Preguntas directrices

- ∫ ¿Existe relación directa entre la destilación y la concentración de metanol en bebidas alcohólicas?
- ∫ ¿Es fundamental hacer una correcta medición del grado alcohólico para determinar la concentración de metanol en las bebidas alcohólicas analizadas?
- ∫ ¿Se requiere del análisis cuantitativo por cromatografía de gases de la concentración de metanol en las bebidas alcohólicas?
- ∫ ¿Existe la necesidad de estandarizar un método analítico para la determinación de la concentración de metanol por cromatografía de gases?
- ∫ Se requiere determinar los parámetros para validar un método analítico satisfaciendo lo que dice la norma ISO/IEC 17025.

1.2.6. Delimitación

Área:	Química Analítica
Sub-área:	Análisis Cuantitativo
Sector:	Alimentos
Sub-sector:	Bebidas alcohólicas
Situación geográfica:	Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato
Espacial:	Octubre 2011 - Julio 2012

1.3. Justificación

En función de la industrialización que avanza y las civilizaciones ganan terreno, también crecen sus malas artes, existen parásitos en la sociedad que viven a costa de ella y se enriquecen a beneficio del fraude. Así como el verdadero cultivador de las ciencias se desvela por arrebatar un secreto a la naturaleza para aplicarle en beneficio de la sociedad, así mismo esos falsarios de oficio trabajan y discurren día y noche para inventar engaños. A tal altura ha llegado la sofisticación del engaño que es preciso recurrir a todos los medios imaginables para contrarrestarlos. [5]

La industria de las bebidas alcohólicas emplea a varios millones de personas en todo el mundo, y cada diferente tipo de bebida produce unos ingresos del orden de billones de dólares anuales. Se pueden obtener licores destilados a partir de muchos materiales, entre los que se encuentran las masas fermentadas de cereales, los zumos de fruta fermentados, jugo de azúcar de caña, melazas, miel y jugo de cactus.[6]

La cromatografía de gases es una técnica analítica rápida, precisa y exacta que tiene un costo relativamente bajo y amplia aplicabilidad a las separaciones analíticas, además brinda información cuantitativa acerca de las especies que separa. [7]

El estandarizar parámetros para validar un método analítico que permita la cuantificación de metanol utilizando cromatografía de gases es importante, porque de esta forma el laboratorio LACONAL estará en la capacidad de brindar resultados confiables y sobre todo que cumplan con los requerimientos que exige la Norma técnica ecuatoriana NTE-INEN ISO 17025. [25]

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Estandarizar parámetros para validar un método analítico que permita la cuantificación de la concentración de metanol en bebidas alcohólicas utilizando cromatografía de gases.

1.4.2. Específicos

- Establecer los parámetros físicos que permitan la preparación de la muestra por medio de la destilación previa.
- Determinar la curva de calibración óptima, los límites de detección y de cuantificación, necesarios para la validación de un método.
- Evaluar las concentraciones de metanol en materiales de referencia.
- Cuantificar la concentración de metanol en muestras de bebidas alcohólicas.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes investigativos

En los últimos años el desarrollo de la instrumentación química para análisis cuantitativos ha servido para controlar los límites permisibles de sustancias que resultan tóxicas para el cuerpo humano y que se encuentran en las bebidas alcohólicas ya sea como producto congénere o como adulterante.

La cromatografía de gases es una técnica de separación analítica que ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios en los años 50, se la utiliza en la resolución de diversos problemas en la industria, en la medicina, en la biología y en el análisis ambiental, convirtiéndose en la actualidad como una herramienta para el control en una gran variedad de áreas. [8]

Aunque muchos productores de alcohol tienen ciertas obligaciones con respecto a la salud pública (por ej. control de calidad, advertencias para la salud), sus metas principales muchas veces se contraponen con ella. De particular preocupación es la globalización del mercado del alcohol, donde las compañías buscan ampliar sus mercados y por consiguiente que haya una mayor disponibilidad y consumo de alcohol. [1]

En la actualidad el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que los métodos analíticos que emplean para sus análisis, proporcionan resultados fiables, los mismos que son resultado de una previa validación en la que se verifica y documenta la adecuación de requisitos determinados y previamente establecidos para resolver un problema analítico particular. [9]

Según la norma ISO/IEC 17025, los laboratorios deben validar los métodos que se utilicen en el laboratorio, tanto los desarrollados por ellos

mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrolladas por otros laboratorios. [25]

2.1.1. Fermentación de carbohidratos.

Es el proceso de síntesis química mas antiguo empleado por el hombre, y hasta la actualidad sigue siendo de gran importancia para la preparación de alcohol etílico y de otros alcoholes. Este proceso se da gracias a la acción de las levaduras sobre los azúcares, los mismos que proceden de varias fuentes como la melaza de caña de azúcar o del almidón que se obtiene de varios granos, por esto al alcohol etílico también se lo conoce como el alcohol de granos. [10]

Los azúcares por acción de la fermentación se transforman en etanol, este proceso ocurre cuando la glucosa por medio de la glucolisis se transforma en piruvato, y este se descarboxila en una reacción irreversible catalizado por acción de la enzima piruvato descarboxilasa, como se muestra en la figura 2 el resultado de esta reacción da acetaldehído que se reduce a etanol a través de la enzima alcohol deshidrogenasa.

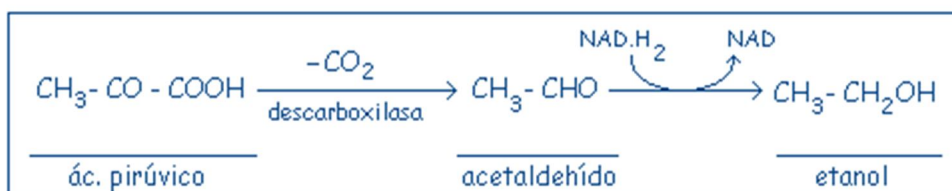


Figura 2. Transformación de ácido pirúvico a etanol.

2.1.2. Alcohol etílico

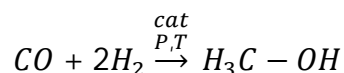
La norma técnica ecuatoriana INEN 375 es el producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos que han sufrido fermentación alcohólica, como también el producto de la rectificación de aguardientes naturales y que puede ser utilizado en la fabricación de bebidas alcohólicas.

2.1.3. Metanol.

El alcohol metílico es el más simple de los alcoholes, se caracteriza por ser incoloro, inflamable y tóxico, fue descubierto por Boyle en 1661 en el

alquitrán de madera, se lo denominaba como o alcohol de madera por la forma en la que se lo obtenía originalmente, destilando esta materia prima en ausencia de aire. [11]

En la actualidad el metanol se obtiene a gran escala a partir del gas de agua o gas de síntesis como se muestra en la ecuación [12]



Esta reacción se produce a una temperatura de 300-400 °C y a una presión de 200-300 atm. Los catalizadores usados son ZnO o Cr2O3. El gas de síntesis (CO + H₂) se puede obtener de formas distintas una de las formas de obtención del gas de síntesis es a partir de la combustión parcial del gas natural en presencia de vapor de agua. [13]

El metanol es un disolvente industrial que se emplea como materia prima en la fabricación de formaldehído, se utiliza como anticongelante en vehículos, combustible de bombonas de camping-gas, disolvente de tintas, tintes, resinas y adhesivos. Es altamente inflamable y la mezcla vapor aire es explosiva, existen varias formas de causar daño en el humano como la inhalación que por ser más pesado que el aire puede causar asfixia en espacios poco ventilados, teniendo como síntomas principales tos, vértigo, dolor de cabeza y náuseas. Es fácilmente absorbible por la piel causando irritación, y su ingesta conduce a una intoxicación sistemática grave que pueden ser precedidos por un período asintomático latente, provocando dolor abdominal, cansancio, pérdida del conocimiento y vómitos.

La toxicidad por ingestión es de 0,1g metanol/kg peso corporal o más, es considerada como grave, la ingestión de más de 1 g metanol/kg peso corporal siendo potencialmente letal. La exposición por inhalación de una concentración de más de 1309 mg/m³ (1000 ppm) o el contacto prolongado o extenso de la piel puede causar también toxicidad sistémica. [14]

El metanol no producto de la fermentación alcohólica, su presencia se da por la desesterificación de las pectinas estearasas presentes en las frutas. El contenido de metanol es de 0,5 g /100g de alcohol en vino tinto, 30mg/100ml en brandy, en whisky 15 mg/100ml y en ron 10 mg/100ml, aún cuando este tipo de bebidas alcohólicas es destilada para aumentar el contenido de alcohol etílico y disminuir otros alcoholes contaminantes que pueden ser congéneres de la producción de estas bebidas. [15]

2.1.4. Bebidas alcohólicas.

Según la norma técnica ecuatoriana INEN 362 indica que es el producto obtenido mediante fermentación y la destilación de jugos y otros derivados de la caña, sometido a rectificación de modo que conserve sus características organolépticas. También se denomina aguardiente o aguardiente de caña, indica que debe ser incoloro o ambarino, con sabor y olor característicos de aguardiente de caña rectificado, además no debe ser adicionado ningún tipo de edulcorantes artificiales ni colorantes diferentes al caramelo de sacarosa, esencias naturales o artificiales que modifiquen sus características organolépticas, ni bonificaciones artificiales. [16]

Tabla 2. Requisitos del aguardiente de caña rectificado.

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO.
Grado alcohólico a 15°C	°GL			INEN 340
A nivel del productor		85	-	
A nivel de consumidor		30	50	
Acidez total como ácido acético	*	-	40	INEN 341
Esteres, como acetato de etilo	*	-	80	INEN 342
Aldehídos como etanal	*	-	20	INEN 333
Furfural	*	-	1,5	INEN 344
Alcoholes superiores	*	-	150	INEN 345
Metanol	*	-	10	INEN 347
Congéneres	*	18	250	

Fuente: NTE-INEN 362

Existen varias definiciones relacionadas con las bebidas alcohólicas, como se indica a continuación:

Aguardiente anisado.- Es el producto que se obtiene de la destilación de una maceración de anís ya sea el común o el estrellado en aguardiente rectificado, con o sin adición de otras sustancias aromáticas o también mezcla de aguardientes rectificados con esencias naturales de anís, seguida o no de destilación. [17]

Bebidas alcohólicas. Son los productos alcohólicos aptos para el consumo humano, provenientes de la fermentación, destilación, preparación o mezcla de los mismos, de origen vegetal, salvo las preparaciones farmacéuticas. [17]

Grado alcohólico. Es el volumen de alcohol etílico expresado en centímetros cúbicos contenidos en 100cm³ de bebida alcohólica, a una temperatura determinada. [17]

Grado absoluto. Es el producto de multiplicar el grado alcohólico, en Gay Lussac, por el volumen medido en litros. Debe expresarse en litros. [17]

Grado alcohólico aparente. Es el grado de una mezcla hidroalcohólica pura, indicado por el alcoholímetro de Gay Lussac a una temperatura diferente a la de referencia. La lectura de un grado alcohólico aparente debe darse siempre indicando la temperatura a la cual dicha lectura fue tomada. También se considera grado alcohólico aparente la lectura alcoholimétrica de una mezcla. En este caso, para determinar el grado alcohólico real, debe someterse a un proceso de destilación, hasta obtener una, mezcla hidroalcohólica pura. [17]

Licor. Es la bebida alcohólica obtenida mezclando o redestilando alcohol etílico rectificado extra neutro o aguardiente de caña rectificado, con aditivos alimentarios de uso permitido, producidos por destilación, infusión, percolación o maceración, pudiendo edulcorare con azúcar p miel, coloreados con sustancias de uso permitido.

Se clasifican en:

Licor seco.- Es el producto que contiene menos de 10g/l de azúcares.

Licor semiseco.- Es el producto que contiene azucares comprendidos entre 10 y 50 g/l

Licor dulce.- Es el producto cuyo contenido de azúcares está comprendido entre 50 y 250 g/l.

Licor crema o crema.- Es el producto de consistencia viscosa que contiene más de 250 g/l de azúcares.

Licor escarchado. Es el producto sobresaturado de azúcar. [18]

En la tabla 3 se indican los requisitos de los licores

Tabla 3. Requisitos de los licores

Requisitos	Unidad	A		B		C		Método de ensayo
		Mín.	Máx	Mín.	Máx	Mín.	Máx	
Grado alcohólico a 15°C	GL	15	45	15	45	15	45	INEN 340
Acidez total. Como acido acético	*	-	1,5	-	15	-	40	INEN 341
Esteres como acetato de etilo	*	-	2	-	5	-	30	INEN 342
Aldehídos como etanal	*	-	0,5	-	2	-	1,0	INEN 343
Alcoholes superiores	*	-	0,5	-	5	-	150	INEN 345
Metanol	*	-	2	-	6	-	10	INEN 347

Fuente: NTE-INEN 1837.

A.- Licores fabricados en base de alcohol etílico rectificado extra neutro

B.- Licores fabricados en base de alcohol etílico rectificado

C.- Licores fabricados en base de aguardiente de caña rectificado.

*.- mg/100cm³.

Brandy.- “Es el producto obtenido por destilación de mostos de uvas fermentados, sometido a un período de añejamiento no inferior a 3 años, en barriles de roble, de tal manera que al final posea el gusto y el aroma que le son característicos.” [19]

En la tabla 4 se indica los requerimientos del brandy

Tabla 4.- Requisitos del brandy

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO.
Grado alcohólico a 15°C	°GL	38	45	INEN 340
Acidez total como ácido acético	*	-	100	INEN 341
Esteres, como acetato de etilo	*	-	60	INEN 342
Aldehídos como etanal	*	-	40	INEN 333
Furfural	*	-	10	INEN 344
Alcoholes superiores	*	-	240	INEN 345
Metanol	*	-	30	INEN 347
Congéneres	*	57	450	

*.- mg/100cm³ de alcohol anhidro.

Fuente: NTE-INEN 366

Ron.- “Es la bebida alcohólica obtenida exclusivamente de materias provenientes de la caña de azúcar, sometidas a los procesos de fermentación alcohólica, destilación y subsecuente añejamiento natural mínimo de un año en barriles de roble de no más de 700 litros, en tal forma que al final posea el aroma y el gusto que son característicos del ron. [20]

En la tabla 5 se indica los requerimientos del ron

Tabla 5.- Requisitos del Ron

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO.
Grado alcohólico a 15°C	°GL	35	48	INEN 340
Acidez total como ácido acético	*	-	100	INEN 341
Esteres, como acetato de etilo	*	-	100	INEN 342
Aldehídos como etanal	*	-	20	INEN 333
Furfural	*	-	1,5	INEN 344
Alcoholes superiores	*	-	150	INEN 345
Metanol	*	-	10	INEN 347
Congéneres	*	18	300	

*.- mg/100cm³ de alcohol anhidro.

Fuente: NTE-INEN 363

Vino.—“Es el producto obtenido mediante la fermentación del mosto de uvas.”

[21]

En la tabla 6 se indica los requerimientos del vino.

Tabla 6.- requisitos del vino.

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	M. ENSAYO.
Grado alcohólico a 15°C	°GL	8	23	INEN 340
Acidez volátil como ácido acético	g/l	-	100	INEN 341
Acidez total como ácido tartárico	g/l	-	100	INEN 341
Glicerina	*	-	20	INEN 355
Cenizas	g/l	-	1,5	INEN 348
Cloruros, como cloruro de sodio	*	-	150	INEN 345

Metanol	**	trazas	0,5	INEN 347
*	cm ³ por 100 cm ³ de alcohol anhidro			
**	g por 100 g de alcohol anhidro			

Fuente: NTE-INEN 372

Vino de frutas.- “Es el producto obtenido mediante la fermentación del mosto de frutas.” [22]

En la tabla 7 se indica los requerimientos del vino de frutas.

Tabla 7.- requisitos del vino de frutas

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	M. ENSAYO.
Grado alcohólico a 15°C	°GL	5	18	INEN 340
Acidez volátil como acido acético	g/l	-	2	INEN 341
Acidez total como acido tantárico	g/l	4	16	INEN 341
Glicerina	*	1	10	INEN 355
Cenizas	g/l	-		INEN 348
Cloruros, como cloruro de sodio	*	-	150	INEN 345
Metanol	**	trazas	0,02	INEN 347
*	cm ³ por 100 cm ³ de alcohol anhidro			
**	g por 100 g de alcohol anhidro			

Fuente: NTE-INEN 374

2.1.5. Cromatografía de gases.-

La cromatografía consiste en la separación de compuestos para poder identificarlos, cuantificarlos y purificarlos, siendo una de las técnicas analíticas mas sensibles, la cromatografía de gases (Figura 3), la misma que está basada en un soluto gaseoso que es transportado por una fase móvil gaseosa, la fase estacionaria suele ser un liquido no volátil que recubre el interior de una columna, esta es la forma más común de cromatografía de gases conocida como cromatografía de reparto gas-liquido, en ocasiones la fase estacionaria

contiene partículas sólidas en donde el soluto puede adsorberse, a esta técnica se la denomina cromatografía de adsorción gas-sólido.

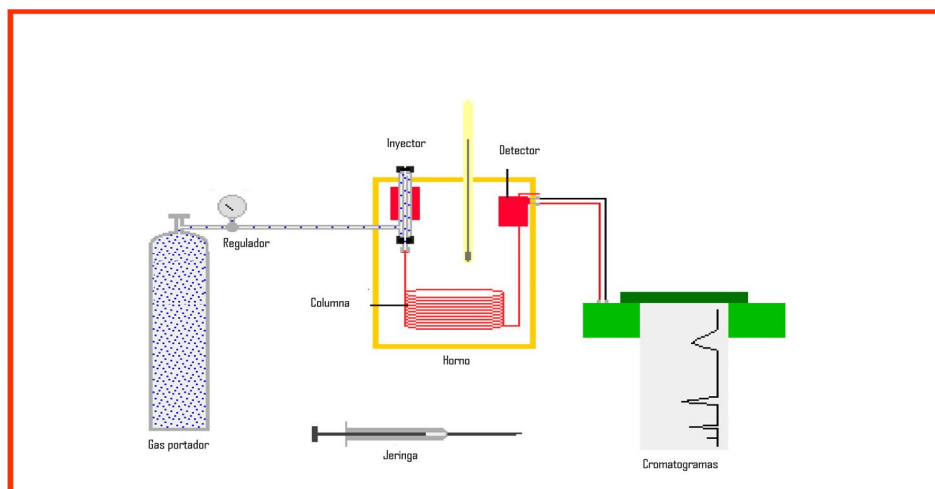


Figura 3.- Diagrama esquemático de un cromatografo de gases

Los principales componentes en un sistema de cromatografía de gases (Figura 3) son: gas portador, el puerto de inyección, el horno del inyector el horno que contiene la columna, el horno del detector, el detector y el sistema de registro e integración siendo este un software computarizado. La velocidad de flujo del gas acarreador se controla para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar las variaciones y ruidos en el detector. [23]

Gas portador.- Es el que cumple la función de fase móvil, el Helio es el mas utilizado pero también se utilizan otros como el Nitrógeno (N_2), Argón (Ar) y el Hidrógeno (H_2), los mismos que vienen en tanques presurizados con reguladores de presión, calibradores y medidores para controlar la velocidad en el flujo.

Sistema de inyección de muestra.- Se usan microjeringas calibradas para inyectar la muestra en el septum de caucho o silicona localizado en la cabeza de la columna, el mismo que se encuentra a una temperatura sobre el punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra, la cantidad a inyectar está entre el 1ul hasta los 20 ul.

Columnas y hornos de columnas.- Existen dos tipos de columnas las empaquetadas y las tubulares abiertas o capilares, siendo las segundas las más utilizadas en la actualidad de los análisis cromatográficos por ser más

rápidas y eficientes. Las columnas varían de longitud desde 2 metros hasta 50 metros, son de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón, son enrolladas a fin de que encajen en el horno.

La temperatura óptima de la columna se la da en el horno, y depende del punto de ebullición de las muestras y el grado de separación necesario, en el caso de muestras con un intervalo de ebullición amplio, frecuentemente se utiliza un programa de temperaturas o rampas, en donde se incrementa la temperatura de forma continua o escalonada, según avanza la separación.

Sistemas de detección.- Se han investigado y empleado muchos sistemas de detectores en la cromatografía de gases, son elegidos en función de las siguientes características:

- Sensibilidad adecuada. Ubicadas entre 10^{-8} a 10^{-5} gramos de soluto por segundo.
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Respuesta lineal a solutos que abarque varios ordenes de magnitud.
- Intervalo de temperatura, desde la ambiental hasta aproximadamente 400°C.
- Tiempo de respuesta breve e independiente de la velocidad de flujo.
- Alta fiabilidad y facilidad de empleo.
- Similitud en la respuesta a todos los solutos.
- Que no destruya la muestra.

El detector de ionización de llama (FID) es el mas aplicable y utilizado en cromatografía de gases (Figura 4), funciona enviando el efluente de la columna hacia una pequeña llama de aire/hidrógeno, los efluentes generalmente orgánicos producen iones y electrones cuando se descomponen químicamente a la temperatura de la llama aire/hidrógeno, esta monitorización de la corriente que se da por captar las cargas permite la detección, la recolección de los iones y electrones se da por la aplicación de varios centenares de voltios entre la punta del mechero y un electrodo colector que se encuentra encima de la llama, esta corriente resultante en amperios se mide en un picoamperímetro.

[23]

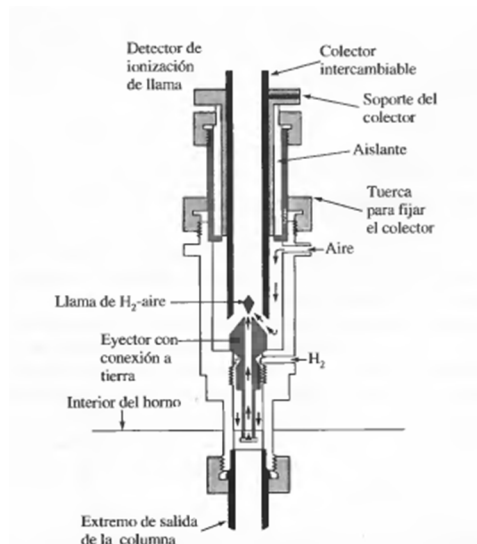


Figura 4.- Detector de ionización de llama característico.

2.1.6. Análisis cuantitativos.-

La cromatografía de gases se basa en la comparación de las áreas o alturas de los picos del analito, frente al de uno o más patrones, en condiciones controladas se puede tener que ambos parámetros varían con la concentración. Los cromatógrafos modernos están equipados con computadores y software que brindan medidas de áreas de pico relativas.

Calibrado por patrones.- Es el método más directo para análisis cuantitativo por cromatografía de gases, se prepara una serie de disoluciones patrón de composición que se aproxima a la de la disolución desconocida. Los cromatogramas obtenidos se representan gráficamente ya sean sus alturas o áreas de pico en función de la concentración obteniendo una curva de calibración. Para lograr mayor exactitud se requiere calibrar con frecuencia.

Método de patrón interno.- La utilización de patrones internos eleva la precisión cuantitativa, ya que minimiza las incertidumbres que se originan en la inyección de la muestra, velocidad de flujo y variaciones en las condiciones de la columna. Este procedimiento consiste en introducir una cantidad similar de un patrón interno en cada patrón y muestra, y se usa como parámetro analítico la proporción del área del pico del analito sobre el área del pico del patrón interno, para que el método tenga menor error es necesario que el pico del patrón interno esté alejado de los picos de los componentes de la muestra, que

no forme parte de la misma y se conozca su concentración, la utilización de patrón interno a logrado precisiones de 0,5 a 1 % según informes. [7]

2.1.7. Validación de métodos analíticos.

“La validación de métodos emplea un conjunto de pruebas que comprueban todas las hipótesis en las que se basa el método analítico, y establecen y documentan las características de rendimiento de un método, demostrando así si dicho método es adecuado para un propósito analítico particular. Las características de rendimiento de los métodos analíticos son: la aplicabilidad, la selectividad, el calibrado, la veracidad, la fidelidad, la recuperación, el rango de funcionamiento, el límite de cuantificación, el límite de detección, la sensibilidad y la robustez. Pueden añadirse la incertidumbre de la medición y la adecuación al propósito.” [24]

Para la validación de un método analítico es necesario cumplir con ciertas exigencias que incluye la norma técnica INEN ISO/IEC 17025 como son:

- Organización funcional
- Personal suficiente y capacitado
- Instalaciones adecuadas
- Métodos escritos, actualizados y aprobados
- Equipos apropiados, cualificados
- Procedimientos apropiados para la toma de muestras
- Reactivos adecuados y soluciones valoradas.
- Material auxiliar apropiado
- Patrones estandarizados para el análisis y material de referencia
- Verificación y control de los resultados llevados en registros de los análisis para su posible auditoría
- Información y comunicación de los resultados obtenidos en los análisis realizados
- Higiene y seguridad en el área de trabajo
- Auditorías internas con personal del laboratorio. [25]

Selección, elaboración y normalización del método.

La selección del método está dada por la necesidad tanto del laboratorio como del cliente y de esta forma llegar a resultados satisfactorios, estos métodos deben ser apropiados para las calibraciones y ensayos pertinentes.

Todo ensayo está sujeto de un procedimiento, que debe realizarse especificando las acciones relativas al ensayo, equipos a utilizar reactivos, condiciones ambientales, preparación de estándares, materiales de referencia, muestras de análisis y sus cálculos pertinentes. [24]

Los métodos seleccionados se deben normalizar, de esta forma se pueden corregir y hacer ajustes según sean necesarios para tener un funcionamiento consistente. [26]

Parámetros para la validación.

Selectividad y especificidad.- Es el grado en que un procedimiento se puede determinar con exactitud un analito en presencia de dos o tres componentes en una matriz dada, la selectividad de un método se investiga usualmente estudiando la habilidad de medir el analito de interés en una muestra a la que se han añadido posibles interferentes deliberadamente.

Linealidad.- Es la relación lineal entre la señal y la concentración del analito. $y = a+bx$ donde, y: es la señal del equipo, b: la pendiente y x: la concentración del analito. [27]

Sensibilidad.- Terminado utilizado generalmente en química analítica, se define como la sensibilidad de calibración, o el cambio en la señal de respuesta por cambio unitario en la concentración de analito. [7]

Precisión.- La precisión esta definida como el grado de concordancia mutua entre los datos obtenidos de una misma forma, indica también la medida del error aleatorio o indeterminado, de un análisis, los parámetros de son la

desviación estándar relativa, absoluta, el coeficiente de variación y la varianza. Las medidas más comunes de la precisión son repetibilidad y reproducibilidad [28].

Repetibilidad: es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de concentración del analito en las mismas condiciones de medición; mide la variabilidad de los resultados cuando el método es aplicado por un solo analista, con un mismo equipo, en un periodo de tiempo corto, etc.

Reproducibilidad: es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones de la misma concentración del analito bajo condiciones de medición modificadas, es decir realizar diversas réplicas en distintos días con diferentes instrumentos, analista e inclusive otro laboratorio. [27]

Límite de Cuantificación.- Es un parámetro importante para caracterizar y seleccionar los métodos analíticos. Conceptualmente es más simple que las capacidades de detección. La IUPAC lo define como el valor verdadero de la señal o de la concentración de analito que conducirá a estimaciones o medidas con una desviación estándar relativa especificada. [29]

Límite de detección.- Se define como la concentración más pequeña que se puede detectar a un cierto nivel de confianza, todas las técnicas analíticas tienen un límite de detección, se lo utiliza cuando se realiza una curva de calibrado. [7]

Exactitud.- La norma ISO 3534, la define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado.

Rango de trabajo.- comprendido entre el límite de cuantificación y el valor del patrón con la concentración más alta

Incertidumbre.- Los valores de las magnitudes obtenidas, sea cual sea su complejidad y sensibilidad, siempre tienen asociadas imprecisiones que denominamos incertidumbres experimentales o errores experimentales.

Criterios de aceptación.-

Los criterios de aceptación están establecidos por la necesidad analítica establecidos en los límites de cuantificación, exactitud y precisión; si no se dispone de requisitos obligatorios, la fuente de información es bibliográfica o por la experiencia adquirida durante la normalización del método. [20]

Tratamiento estadístico.-

Se realiza el análisis de varianza simple para los resultados obtenidos, en el cálculo de la precisión por niveles, además de los límites de detección y cuantificación, el intervalo de trabajo y la incertidumbre asociada a cada nivel.

Evaluación de resultados analíticos e informes técnicos.-

Los resultados obtenidos en la realización de la validación, deben ser sometidos a auditorías diarias de laboratorio u hojas de trabajo. Los informes técnicos deben contener la siguiente documentación:

- Referencias de calibración y cualificación de la instrumentación utilizada.
- Métodos que describan el procedimiento para la determinación de cada analito de los parámetros a evaluar.
- Resultados de las cuantificaciones de los parámetros analizados que incluyan copias originales de cromatogramas, de espectros, curvas de calibración, etc.
- Certificado de la validación o documento formal de aprobación que deberá ser firmado por las personas responsables.
- La documentación referente a la validación se deberá archivar adecuadamente durante todo el tiempo de vida del análisis y de los analitos evaluados [31]

La documentación de la validación deberá ser utilizada desde el inicio del análisis y será permanente durante todo el proceso de los análisis.

2.2 Fundamentación filosófica

Los tiempos actuales en los que la nutrición y la alimentación están llenos de intereses económicos y de ciencias falsas controvertidas que únicamente favorecen a los que quieren vender sus productos sin pensar

siquiera en lo que los mismos pueden contener, es por eso que la presente investigación se basa en la idea aristotélica sobre su percepción de ética que se resume en la búsqueda de la felicidad.

Para algunos, la felicidad consiste en los placeres; para otros, en las riquezas; pero el hombre sabio la busca en el ejercicio de la actividad que le es propia al hombre, es decir, en la vida intelectual. Ello no excluye el goce moderado de los placeres sensibles y de los demás bienes, con tal de que no impida la contemplación de la verdad. Sobre esta base desarrolla Aristóteles el concepto de virtud. La virtud consiste en el justo medio. Lo que quiere dar a entender es que el actuar del hombre debe estar regido por la prudencia o regla recta. Hay dos modalidades de virtud: las dianoéticas (que se refieren al ejercicio de la inteligencia) y las éticas (que se refieren a la sensibilidad y los afectos). Todas las virtudes son hábitos que se adquieren por medio de la repetición. La virtud por excelencia es la justicia, la cual consiste en el acatamiento de las leyes y en el respeto a los demás ciudadanos.

[32]

La ética contemporánea ha conocido aportes importantísimos por parte de numerosos autores: los vitalistas y existencialistas desarrollan el sentido de la opción y de la responsabilidad, Max Scheler elabora una fenomenología de los valores. Autores como Alain Badiou han intentado demostrar que esta principal tendencia (en las opiniones y en las instituciones), la cuestión de "la ética" contemporánea, es en realidad un verdadero nihilismo y una amenazante denegación de todo pensamiento. [33]

2.1 Fundamentación legal.

La presente investigación está amparada en la constitución del Ecuador del año 2008 que en su capítulo segundo de los derechos del buen vivir en la sección primera de agua y alimentación en el art. 13 señala que, las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente de alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferencialmente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales.

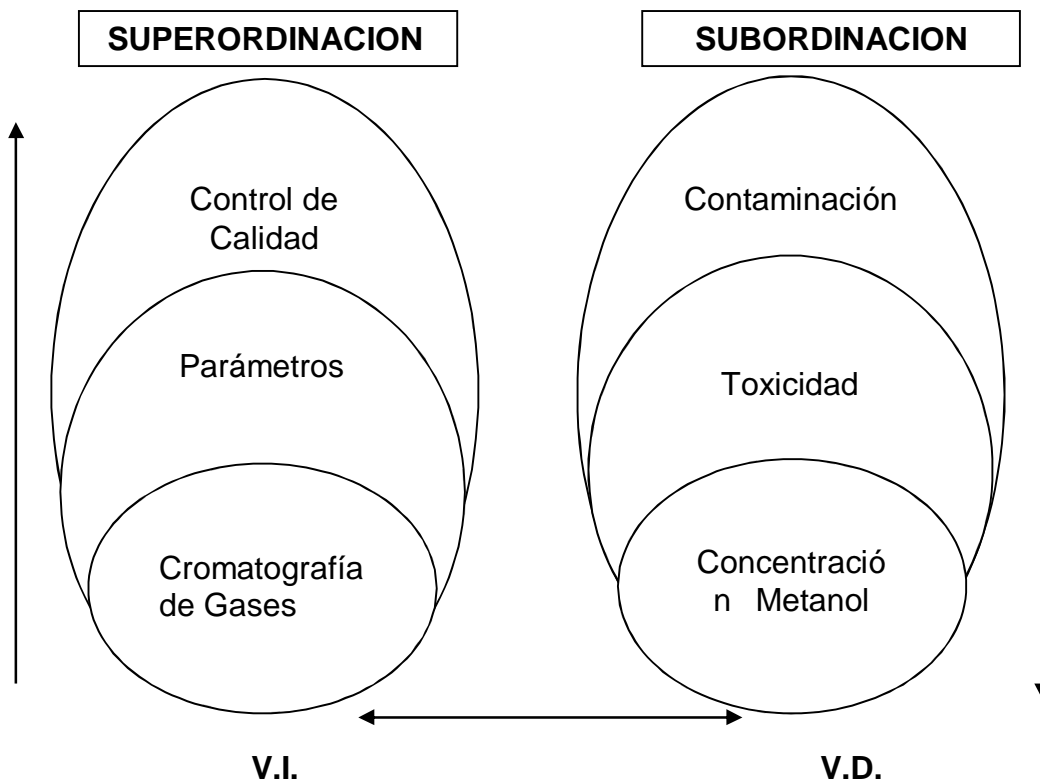
El estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria. [34]

- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0338:92
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0347:78
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0362:92
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0363:92
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0366:87
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0372:87
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1837:91
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1932:92
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2014:94

2.4 Categorías fundamentales

2.4.1 Categorización de variables

CATEGORIZACION DE VARIABLES



Elaborado por: David Luna.

2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis de la Investigación

El empleo de la cromatografía de gases permitirá la cuantificación de la concentración de metanol, a partir de la curva de calibración así como en el material de referencia utilizados para la validación del método analítico.

2.5.2. Hipótesis Estadística

2.5.2.1. Hipótesis Nula

El resultado del análisis cuantitativo cromatográfico determinará si existe concentración de metanol en el material de referencia y sus respuestas experimentales

2.5.2.2. Hipótesis Alternativa

El resultado del análisis cuantitativo cromatográfico no determinará que existe concentración de metanol en el material de referencia y sus respuestas experimentales.

2.4. Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable Independiente:

Estandarización para la validación del método analítico utilizando cromatografía de gases.

Variable Dependiente:

Concentración de metanol en el material de referencia Brandy Fapas.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Enfoque

El presente estudio está enfocado en el análisis de la muestra objeto de estudio para determinar la concentración de metanol, mediante el empleo de un método estandarizando que permita la futura validación por medio de la cromatografía de gases con un detector FID, ya que el metanol puede estar presente en las bebidas alcohólicas ya sea como producto congénere o como adulterante.

3.2 Modalidad básica de la investigación

En este proyecto de investigación, por ser un análisis cuantitativo se emplearán dos tipos de modalidades de investigación una experimental y otra documental.

Experimental

La presente investigación permitió la estandarización de un método para la cuantificación de la concentración de metanol como producto congénere o adulterante de bebidas alcohólicas utilizando la cromatografía de gases con FID como herramienta para el análisis.

Documental

Se realizo una exhaustiva revisión bibliográfica con información sobre estudios realizados sobre el tema de investigación.

3. 3. Nivel o tipo de investigación

Exploratorio.- El nivel de profundización del presente trabajo de investigación es exploratorio ya que por primera vez en el Ecuador se propone un método

estándar para la determinación de niveles de metanol por cromatografía de gases en bebidas alcohólicas con el fin de lograr su futura validación.

Descriptivo.- Se realizó el análisis mediante el uso del cromatógrafo de gases con FID en función del análisis químico cuantitativo de la concentración de metanol.

Asociación de variables

La estandarización de un método analítico para la cuantificación de metanol permitirá evaluar la calidad de las bebidas alcohólicas comercializadas en el país, y de esta forma brindar resultados de calidad a los productores e importadores.

3.4. Método y Técnica de Investigación

3.4.1. Preparación de la muestra.

El presente trabajo se realizó con muestras preparadas de concentración de metanol conocido para la curva de calibración, bebidas adulteradas con metanol y con el material de referencia FAPAS proficiency Test Report 1362 Analysis of Brandy September - October 2011, que sirvió como material de referencia certificado para la cuantificación de metanol en bebidas alcohólicas.

3.4.1.1. Determinación de grado alcohólico

El grado alcohólico de las muestras, fue determinado en base de la norma técnica ecuatoriana NTC-INEN 340-1994

3.4.1.1.1. Materiales y equipos:

- Alcoholímetro de Gay-Lussac, calibrado a 15°C y 20°C graduados en décimas de grado alcohólico, de calidad certificada.
- Termómetro graduado en décimas de grado Celsius (centígrados).

- Matraz volumétrico, de 250 cm³.
- Probeta de capacidad y diámetro adecuados para evitar rozamiento con el alcoholímetro.
- Baño de agua, con temperatura constante de $15 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, ó $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, según el caso, de profundidad igual o superior a 30 cm.
- Núcleos de ebullición.
- Aparato para destilación (figura 5), compuesto por:

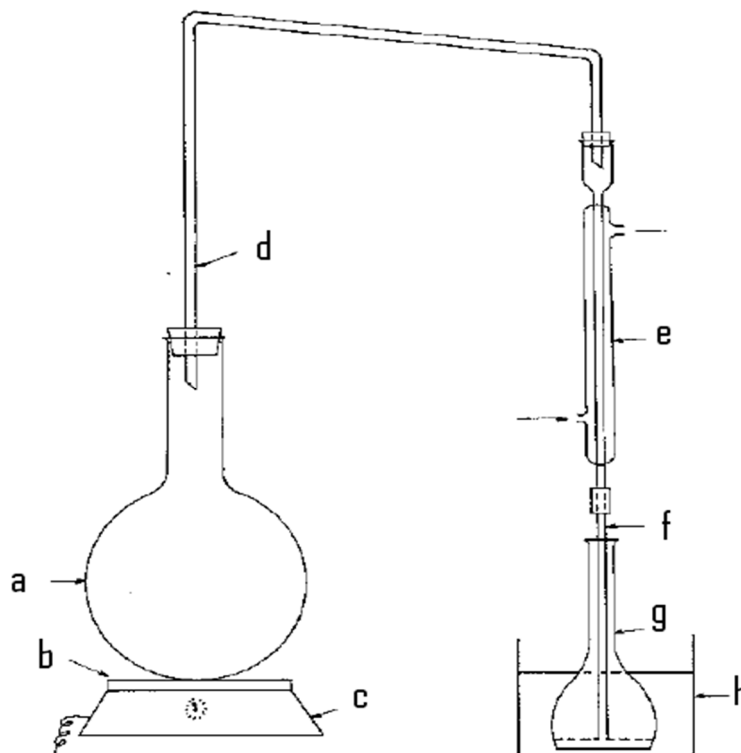


Figura 5. Aparato de destilación

- a) matraz de destilación, de 1000 cm³, con fondo redondo,
- b) malla de asbesto,
- c) fuente eléctrica de calentamiento,
- d) tubo de vidrio delgado, de aproximadamente 6 mm de diámetro interno y de dimensiones 300 x 300 mm x 150 mm,
- e) refrigerante de Liebing de longitud igual o mayor a 400 mm,
- f) tubo de vidrio adecuado para dirigir el destilado al recipiente colector,
- g) matraz volumétrico, de 250 cm³, y
- h) baño de agua con hielo, en el que debe sumergirse el matraz volumétrico.

[23]

3.4.1.1.2. Preparación de la muestra.

- Para productos alcohólicos que contienen extracto seco, debe destilarse previamente la muestra, y determinar en el destilado el grado alcohólico volumétrico utilizando el alcoholímetro Gay- Lussac.
- Lavar cuidadosamente el equipo para destilación con agua destilada y proceder a armarlo.
- Enjuagar el matraz con una porción de la muestra de bebida alcohólica, llenarlo con la muestra hasta sobrepasar la marca de 250 cm³ y tapar el matraz.
- Colocar el matraz en el baño de agua, a temperatura constante de 15° ± 0,5°C ó 20° ± 0,5°C, según el caso, durante 20 minutos y retirar el exceso de muestra que sobrepasa la marca, utilizando una pipeta, hasta obtener el volumen exacto de 250 cm³.
- Transferir el contenido al matraz del aparato de destilación y lavar con tres porciones de 10 cm³ de agua destilada, recogiendo el agua de lavado en el mismo matraz del aparato de destilación. Añadir núcleos de ebullición.
- Destilar lentamente la muestra, recogiendo el condensado en un matraz volumétrico de 250 cm³, al que se añaden previamente 10 cm³ de agua destilada, hasta que se haya recogido 220 cm³ aproximadamente.
- Colocar el matraz en un baño de agua a temperatura constante 15° ± 0,5°C ó 20° ± 0,5°C, según el caso, durante 20 minutos y luego añadir cuidadosamente agua destilada a 15°C ó 20°C, según el caso, hasta completar el volumen de 250 cm³ y homogeneizar.
-

3.4.1.1.3. Procedimiento

- Efectuar la determinación en la misma muestra preparada por duplicado.
- Colocar la muestra preparada en la probeta perfectamente limpia y seca.
- Limpiar y secar cuidadosamente el alcoholímetro y el termómetro e introducirlos suavemente en la probeta con la muestra, manteniéndolos así durante 10 minutos
- Agitar ligeramente para igualar la temperatura del sistema y leer la temperatura.

- Dejar en reposo hasta que desaparezcan las burbujas de aire que se forman en el seno del líquido y efectuar la lectura en el alcoholímetro, considerando el nivel real del líquido y no la elevación del menisco, utilizando una lupa, si fuera necesario.
- Corregir el grado alcohólico aparente medido a 15°C, utilizando la tabla de corrección.
- Corregir el grado alcohólico aparente medido a 20°C utilizando la tabla de corrección.
- Corregir el grado alcohólico aparente Intermedio, por interpolación. [23]

3.4.2. Preparación de la curva de calibración.

La Preparación de la curva de calibración se determino a partir de la solución patrón de metanol con una concentración de 78,677 mg/100ml, como se indica en la tabla B-1 del Anexo B.

3.4.2.1. Materiales

- Balones aforados de 10, 50,100, 1000 ml
- Pipetas volumétricas calibradas de 0.5, 1 y 5 ml

3.4.2.2. Reactivos y soluciones estándares

- Estándar de metanol de 78,677 mg/100ml
- Etanol de alta pureza 99,9%
- Metanol de alta pureza 99,9%
- N-butanol P.A.
- Agua desionizada (0.054 $\mu\text{s/cm}$)

3.4.3. Cuantificación de metanol

Para la cuantificación de metanol, se tomó como referencia la norma técnica ecuatoriana NTC-INEN 2014 “Bebidas alcohólicas determinación de productos congéneres por cromatografía de gases”, además como soporte para el método se uso la técnica de la AOAC 972.11, estos dos métodos sirvieron como guía, porque las condiciones que especifican cada uno son en

cromatógrafos distintos al que se tienen en LACONAL, y fueron acopladas al cromatografo de gases HP- AGILENT 6890.

3.4.3.1. Equipos

- Cromatografo de gases HP-AGILENT 6890 con FID (detector ionización llama)
- Generador de Hidrógeno
- Computador de escritorio con el software CLARITY

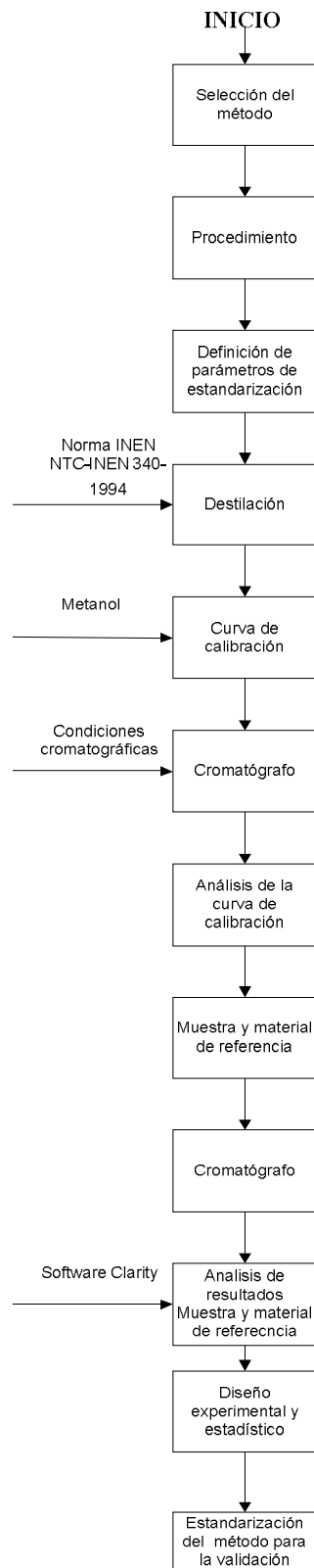
3.4.3.2. Materiales

- Tanque de Nitrógeno seco 4,5 de pureza de 6 metros cúbicos.
- Tanque de Aire medicinal puro de 8 metros cúbicos.
- Balones aforados de 10,50, 100, 250 y 1000 ml
- Pipetas volumétricas calibradas de 0.5, 1 y 5 ml
- Probetas calibradas de 50 a 1000ml.

3.4.3.3. Reactivos y soluciones

- Estándar de metanol de 78,677 mg/100ml
- Etanol de alta pureza 99,9% Borohidruro de sodio
- Metanol de alta pureza 99,9%
- N-butanol P.A.
- Agua desionizada (0.054 $\mu\text{s/cm}$)
- Material de referencia
- Bebidas con concentración de metanol como patrón interno

Diagrama de flujo para la estandarización de los parámetros de validación de un método analítico para cuantificar la concentración de metanol en bebidas alcohólicas utilizando cromatografía de gases:



3.4.4 Estandarización de parámetros para la Validación del Método Analítico

La estandarización de los parámetros para la validación, fueron establecidos según indica la Norma Internacional ISO/IEC 17025, basado en el procedimiento indicado en la norma técnica ecuatoriana NTE-INEN 2014 y las normas de la AOAC para determinación de metanol por cromatografía de gases, en función de esta norma y procedimiento los parámetros de validación se describen a continuación:

Linealidad.-

La linealidad para la curva de calibración se la realizó a partir de una solución con una concentración de metanol de 78,677 mg/100ml, llevando a diluciones (Tabla B-1 Anexo B.) con 7 diferentes concentraciones que van desde 0 hasta 150 mg/100ml de metanol cada una con una concentración de n-butanol como estándar interno de 80,557 mg/100ml, inyectadas cada una en el cromatógrafo de gases y obteniendo valores de sus respectivas áreas en el lapso de dos días y aplicando la linealidad de las mismas para obtener la ecuación:

$$y = bx + a \quad (1)$$

Donde:

y es la relación de las áreas de metanol y n-butanol (Área metanol/ Área n-butanol).

X es la concentración de metanol en mg/100ml

Para la obtención de la concentración (mg/100ml) a partir de las áreas del cromatografo de gases conseguidas se estableció el cálculo con ayuda de la ecuación 2:

$$\text{Concentración de metanol} \frac{\text{mg}}{100\text{ml}} = \left(\frac{\frac{\text{Area de metanol}}{\text{Area del n-butanol}} + a}{m * GL} * Fd \right) \quad (2)$$

Donde:

Fd es el factor de dilución utilizado y,

GL, el grado alcohólico determinado

Con las cifras obtenidas se estableció la curva de calibración y se logró reportar y calcular los siguientes datos:

Ecuación de la recta:

$$\text{relación de Areas} \left(\frac{\text{metabol}}{\text{n-butanol}} \right) = m \left(\text{concentración metanol} \frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \right) + a \quad (3)$$

Coefficiente de correlación:

$$R = 0,9993$$

Límites de confianza de la pendiente:

$$LC_m = m \pm tS_m \quad (4)$$

Límites de confianza de la ordenada al origen:

$$LC_a = a \pm tS_a \quad (5)$$

Determinación de la sensibilidad de linealidad:

La sensibilidad de calibrado y la sensibilidad analítica:

Sensibilidad de calibrado:

La sensibilidad de calibrado esta dado por la pendiente de la recta; m

Sensibilidad Analítica:

Se determina mediante la ecuación:

$$\gamma = \frac{m}{S_s} \quad (6)$$

Donde:

m: pendiente de la recta.

Ss: desviación estándar de la sensibilidad.

Determinación de límite de detección y límite de cuantificación

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se utilizan las siguientes ecuaciones:

Límite de Detección:

$$LOD = \frac{S y/x}{m} * 3 \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}} \quad (7)$$

Donde:

Sy/x : es la desviación estándar de la recta de calibrado

m: es la pendiente de la recta de calibrado

N: es el número de patrones de calibrado

xi: es cada una de las concentraciones de los patrones de calibrado

x : es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado

Límite de Cuantificación:

$$LOQ = \frac{S y/x}{k} * m \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}} \quad (9)$$

Donde:

Sy/x: es la desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado

b1: es la pendiente de la recta de calibrado

N: es el número de patrones de calibrado

xi: es cada una de las concentraciones de los patrones de calibrado

x : es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado

Determinación de la exactitud:

Para la exactitud del método se utilizó el material de referencia certificado FAPAS proficiency Test Report 1362 Analysis of Brandy September - October 2011, utilizando la ecuación:

$$\%Recuperación = \frac{\times Obtenido}{\times Teórico} * 100 \quad (18)$$

Análisis estadístico de los resultados.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba t student que por una distribución de probabilidad estima de la media de

una población normalmente distribuida cuando el tamaño de la muestra es pequeño utilizando las siguientes fórmulas:

$$t_{exp} = \frac{|r\%R|\sqrt{n}}{Cv} \quad (21)$$

$$Cv = \frac{s}{X} \quad (22)$$

Donde:

t _{exp}	valores de t experimentales
Cv	coeficiente de variación
s	desviación estándar
X	promedio del porcentaje de recuperación

Los valores obtenidos se compararon con el valor de "t" a un nivel de confianza del 95%.

3.5. Población y muestra

3.5.1. Diseño Experimental

3.5.1.1. Factores o niveles en estudio para la estandarización de un método analítico para la cuantificación de la concentración de metanol.

TABLA Nº 8. Factores de estudio

Factores	Niveles
A. Concentración de Metanol	a0: 0 mg/100ml
	a1: 1,57 mg/100ml
	a2: 3,15mg/100ml
	a3: 15,74mg/100ml
	a4: 47,21mg/100ml
	a5: 94,41mg/100ml
	a6: 149,49 mg/100ml
B. Día de Experimentación	b1: primer día
	b2: segundo día

Elaborado por: David Luna

3.4.1.2. Tratamientos

Los tratamientos resultantes de la correlación de los factores de estudio en la estandarización de un método analítico para la cuantificación de la concentración de metanol se muestran a continuación:

TABLA N-10 Obtención de los tratamientos resultantes de la correlación de los factores de estudio para establecer la curva de calibración

Tratamientos		Factores de Estudio	
Nº	Codificación	Concentración de Metanol	Días de experimentación
1	a0b1	0 mg/100ml	Primer día
2	a0b2	0 mg/100ml	Segundo día
3	a1b1	1,57 mg/100ml	Primer día
4	a1b2	1,57 mg/100ml	Segundo día
5	a2b1	3,15 mg/100ml	Primer día
6	a2b2	3,15 mg/100ml	Segundo día
7	a3b1	15,74 mg/100ml	Primer día
8	a3b2	15,74 mg/100ml	Segundo día
9	a4b1	47,21 mg/100ml	Primer día
10	a4b2	47,21 mg/100ml	Segundo día
11	a5b1	94,41 mg/100ml	Primer día
12	a5b2	94,41 mg/100ml	Segundo día
13	a6b2	149,49 mg/100ml	Primer día
14	a6b2	149,49 mg/100ml	Segundo

Elaborado por: David Luna

Para la comparación estadística de datos se usara la prueba t de student para determinar los limites de confianza.

Respuestas experimentales:

- Químicas:

Cuantificación de metanol por cromatografía de gases

3.4.2 Muestra

Para el presente análisis se trabajará con metanol grado cromatográfico para la curva de calibración y material de referencia certificado.

3.5. Operacionalización de variables.

Variable Independiente: Empleo de cromatografía de gases

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICAS E INSTRUMENTOS
Estandarización de un método analítico.	<p>Equipo de destilación.</p> <p>Utilización de cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (FID).</p>	<p>- Obtención de resultados confiables de cada parámetro de estandarización para la validación establecidos en los límites permisibles de metanol según las exigencias de la normativa ecuatoriana.</p>	<p>¿Existen cambios importantes en función de la destilación?</p> <p>¿Se estandarizara un método analítico para la cuantificación de metanol y establecer parámetros para su futura validación?</p>	<p>Equipo de destilación.</p> <p>Cromatografo de gases.</p>

Elaborado por: David Luna

Variable Dependiente Cuantificación de metanol.

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICAS E INSTRUMENTOS
Cuantificación de metanol	Concentración de metanol	-Proceso Características establecidas en los resultados a comparar	¿Es necesario realizar comparaciones de la concentración de metanol en muestras de bebidas alcohólicas y un material de referencia?	Tratamiento estadístico y diseño experimental.

Elaborado por: David Luna

3.6. Recolección de información

El diseño experimental planteado tendrá como finalidad obtener datos experimentales reales de la cuantificación de la concentración de metanol en el material de referencia para su aplicación en bebidas, por esto se establece un diseño AxB con dos réplicas y siete respuestas experimentales, dando como resultado 14 pruebas de análisis para establecer la curva de calibración.

Para la matriz se realiza un diseño AxB con dos replicas y 6 respuestas experimentales, del material de referencia, de las muestras de análisis con adición de metanol, y el blanco; dando como resultado 12 pruebas de análisis. Estos parámetros fundamentarán la respuesta que se dé a la hipótesis planteada.

El análisis de la cuantificación de metanol fue realizado en el laboratorio de control y análisis de alimentos LACONAL de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.7. Procesamiento y análisis

El procesamiento de la información obtenida en la fase experimental de la investigación, se realizó en base a un estudio estadístico con la ayuda de hojas de cálculo diseñadas con ecuaciones matemáticas que estableciendo los parámetros de estandarización y validación.

El análisis de la información se basó en la interpretación de los resultados obtenidos del estudio estadístico y sustentado con revisión bibliográfica, lo cual permitió la comprobación de la hipótesis para establecer conclusiones y recomendaciones sobre la investigación desarrollada.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de resultados.

4.1.1. Estandarización del método para la cuantificación de metanol.

Para estandarizar el método de cuantificación de metanol se utilizó el cromatografo de gases HP agilen 6895, con las siguientes condiciones, la presión de nitrógeno fue de 3,9 psi de presión, la temperatura del inyector de 200°C el horno que empezó con una temperatura de 60°C con una rampa de 10°C/min hasta 110°C permaneciendo ahí por 1 minuto, después de esto una nueva rampa de 10°C hasta llegar a los 140°C donde se mantiene por 1minuto, de esta forma se aseguró que los alcoholes con punto de ebullición menor a 100°C puedan ser retenidos por la columna HP-INNOWax, 30m x 0.32mm x 0.25µm. La temperatura del detector se mantuvo en 260°C, de esta forma la circulación del analito se dio por completo y separada. En función a la respuesta de sus áreas se pudo establecer los parámetros de estandarización para una futura validación.

4.1.2. Estandarización de los parámetros de validación

4.1.2.1. Curva de Calibración.

La curva de calibración para Metanol se la preparo como se indica en la Tabla B-1. Los datos de la relación de áreas entre metanol y n-butanol, obtenidos experimentalmente como indican los cromatogramas de las gráficas C-2, C-3, C-4; C-5, C-6, C-7, C-8, interactuaron con los días de inyectado como se reportan en la Tabla A-1.

El análisis de varianza reportado en la Tabla B-2, indica que en la interacción doble existen diferencias significativas, entre los factores de estudio. Al analizar los factores principales de manera individual se encuentra diferencia estadística significativa en todos los casos, lo cual denota que al modificar los niveles de cada factor, varía notablemente la relación de áreas

obtenidas en el cromatografo. Por esto se busca la interacción de los dos factores seleccionados para el presente estudio y así definir la curva de calibración óptima en donde no existan diferencias entre las concentraciones y los días de corrido.

El Gráfico B-1, señala que los niveles de la curva de calibración y su ascendencia desde la mínima concentración hasta la concentración final. La Tabla B-3 indica el análisis de Tukey para las diferencias significativas de las distintas concentraciones en los dos días, indicando que la diferencia de las medias entre un día y otro son similares lo que indica la realización correcta de la curva y su respectiva corrida en el cromatógrafo de gases. En el gráfico B-2 y B-3 se ven las interacciones y las relaciones de las áreas cromatográficas en sus distintas concentraciones observándose su similitud entre los días de análisis.

4.1.2. 2.Linealidad.

La linealidad se determinó estadísticamente analizando las concentraciones (mg/100ml) distintas de metanol, y las relaciones experimentales de las áreas de metanol y n-butanol, de los datos promediados del análisis de varianza realizado para la curva de calibración.

En la gráfica G-1 se indica la recta ajustándose a un modelo lineal con un coeficiente de regresión igual 0,9987, que para efectos de análisis de laboratorio cumple con el límite mínimo permitido para una regresión que es de 0,995. La ecuación de la curva de calibración que ajusta el modelo para la los estándares establecidos es:

$$A1/A2 = 0,0073[\text{metanol}]-0,005$$

Los valores máximos y mínimos de confianza del presente método analítico fluctúan entre $\pm 0,00027$ para la pendiente y $\pm 0,0019$ para la ordenada como se indica en la Tabla B-4.

4.1.2.3. Determinación de la sensibilidad

La sensibilidad de la calibración se da por el valor de la pendiente en la ecuación de la recta correspondiente a 0,0073, en tanto que la sensibilidad analítica dio un valor de 0,0195.

4.1.2.4. Determinación del límite de detección y del límite de cuantificación

El límite de detección (LOD), cantidad mínima de analito presente en la muestra, dio un valor de 0,6519 mg/100ml (ANEXO B).

El límite de cuantificación (LOQ), cantidad de analito que ha sido detectada dio un valor de $4,40 \times 10^{-06}$ mg/100ml. (ANEXO B).

4.2. Material de referencia.

4.2.1 Preparación de la muestra,

El material de referencia Brandy Fapas resultado de una ronda inter laboratorios llevada a cabo en el mes octubre del 2011, convertido en material de referencia después de su respectiva evaluación, como está indicado en el procedimiento la muestra fue sometida a una destilación previa para obtener el grado alcohólico real tal como se indica en la Tabla A-5.

En las tablas B-5, B6 y B-7 se indica la comparación de medias y desviaciones entre el resultado real y el obtenido en las distintas réplicas durante tres días.

4.3 Verificación de Hipótesis

Después de realizar el análisis estadístico en las tablas B-5, B6 y B-7, es posible aceptar la hipótesis nula, lo que establece que los tratamientos resultantes del producto de la correlación de los factores de estudio no presentan diferencias significativas en sus medias de las respuestas experimentales al momento de ser relacionadas con los valores críticos tabulados a niveles de confianza del 95%.

CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones:

5.1.1 El presente estudio estableció 3 pasos para el proceso de estandarización, preparación de la curva de calibración, destilación y medida de grado alcohólico del material de referencia y la cuantificación de la concentración de metanol por medio del cromatografo de gases acoplado a un detector de ionización de llama. En la validación de métodos analíticos para laboratorios existen varios pasos que se deben cumplir. Por ello, el presente estudio se basó en estandarizar el método que permita cuantificar la concentración de metanol existente en bebidas alcohólicas, y algunos de los parámetros de validación, utilizando como herramienta principal de análisis al GC-FID y como muestra el material de referencia con concentración de metanol conocida.

5.1.2 Según la curva de calibración los resultados indican una interacción entre los días de inyectado y las concentraciones inyectadas en el cromatografo. Esto demuestra que la relación de áreas de metanol y n-butanol para las diferentes concentraciones se mantienen con una diferencia mínima entre los dos días de corrida. El coeficiente de correlación lineal obtenido fue de 0,9993 que está dentro de los límites de aceptación para la linealización.

5.1.3 El valor obtenido para el límite de detección se considera cualitativo porque no afecta directamente en la medición de la respuesta del equipo, en tanto que el límite de cuantificación es indicativo de que se puede detectar el metanol sin incurrir en falsos positivos, y quedando establecida así la curva de calibración de manera confiable.

5.2.3 La destilación del material de referencia dio pequeñas variaciones en las lecturas del alcoholímetro de Gay-Lussac que no influyeron en los posteriores cálculos para determinar la concentración de metanol ya que la determinación según las normas indica que los resultados deben ser reportados únicamente en alcohol anhidro, es decir en base seca.

5.2.4 Para el análisis estadístico de la prueba de hipótesis realizada entre la concentración de metanol reportada y la concentración obtenida, no se vieron diferencias en un límite de confianza del 95% por lo que la comprobación de la estandarización del método fue verificada. El presente método analítico empleado se puede considerar sumamente útil para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas por no presentar diferencias significativas entre las corridas del material de referencia y lo reportado.

5.1.5 En la investigación desarrollada, no se emplearon estándares certificados para la preparación de la curva de calibración, sin embargo el metanol utilizado fue de pureza cromatográfica. Para reducir el error se utilizó el estándar interno n-butanol, así la relación de áreas al momento de calcular la concentración no afectó en los resultados obtenidos.

5.1.6 Se cuantificaron diez muestras de bebidas alcohólicas, que por confidencialidad del laboratorio no se han colocado sus marcas, sacando su respectivo grado alcohólico y su concentración de metanol obtenida en el cromatografo de gases, de estas muestras tres no presentan contaminación por metanol, pero hay otras tres que salen de los límites permisibles indicados en la norma técnica ecuatoriana.

5.2 Recomendaciones.

5.2.1 La determinación precisa y exacta del grado alcohólico para bebidas alcohólicas es de suma importancia porque el reporte de los resultados se expresa directamente como alcohol anhidro. Para ello, es importante tener en consideración las temperaturas indicadas en la escala Gay Lussac, sea únicamente a 15 °C o 20°C. Por otro lado, el procedimiento para la destilación

de las muestras que lo necesitan debe realizarse bajo la normativa existente, en este caso, la norma Técnica ecuatoriana INEN 340 porque únicamente de esa manera se garantiza el resultado.

5.2.2 Para la correcta cuantificación del metanol se requiere que la señal del cromatógrafo mantenga una línea base lo más cercana al cero, para de esta forma evitar errores de lecturas del detector. Esto se logra acondicionando la columna en las condiciones de inyección, pero únicamente utilizando solvente como hexano. Adicionalmente, si el detector presenta señales con valores altos, es recomendable realizar una limpieza del mismo.

5.2.3 El método propuesto puede ser utilizado en la cuantificación de cualquier otro tipo de alcoholes, ésteres y aldehídos congéneres, pero para ello se requiere previamente la estandarización del método para cada componente.

5.2.4 Uno de los mayores inconvenientes que se presenta en nuestro medio es el acceso a estándares de referencia, los mismos que únicamente se consiguen por medio de importación, lo cual genera mucho tiempo de espera, además de los elevados costos. Si existe la necesidad de validar un método, lo primero que se debe realizar es solicitar la importación de dichos reactivos.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos

- **Título:** Verificación del contenido de metanol en Bebidas alcohólicas mediante la utilización de cromatografía de gases y el cumplimiento de las normativas técnicas ecuatorianas

- **Unidad Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato.
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
Laboratorio de Análisis y Control de Alimentos LACONAL.

- **Beneficiario:** Estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos: Carrera de Ingeniería Bioquímica, y la sociedad en general

- **Director del Proyecto:** Dr. Roman Rodríguez Ph. D.
- **Personal Operativo:** Egdo. Eduardo Luna
- **Tiempo de Duración:** 10 meses
- **Lugar de Ejecución:** LACONAL
- **Costo:** 5000 \$.

6.2 Antecedentes de la Propuesta

El metanol es un alcohol extremadamente tóxico y nocivo para la salud de los seres humanos, muy utilizado en los análisis químicos y como solvente industrial puede estar presente en bebidas alcohólicas. Dado que la comercialización de las mismas implica la obtención de grandes ganancias económicas, algunos productores utilizan materia prima de procedencia dudosa y esto implica que la calidad de las mismas no satisfaga los parámetros establecidos en las distintas normas técnicas que tienen límites máximos permisibles de los diferentes compuestos ya sean por producto de la fermentación o congénere de las bebidas alcohólicas.

Las bebidas alcohólicas están sujetas a verificaciones del cumplimiento de los estándares de calidad, pero en el Ecuador el poco o casi inexistente control a generado que no se conozca a ciencia cierta si las mismas cumplen con lo establecido en las normas técnica ecuatorianas INEN.

Por este motivos, aprovechando el instrumental existente en el laboratorio de Control y Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, después de la estandarización del método de análisis por cromatografía de gases para la determinación de la concentración de metanol en bebidas alcohólicas, monitorear la calidad de los licores nacionales e importados, y de esta forma establecer un centro de control de calidad que brinde información técnica sobre el cumplimiento o no de los limites señalados en las NTE-INEN.

6.3 Justificación

La importación de las bebidas alcohólicas en países en vías de desarrollo es bastante elevada, ya sea por la publicidad o simplemente la necesidad de beber algo extranjero, la comercialización de licores importados produce unos ingresos del orden de billones de dólares anuales. Entre las bebidas de mayor demanda para la importación están los vinos, whisky, tequila, vodka, ron entre otras, que se expanden en el país sin una certificación extra que evalué la calidad real de estas bebidas.

La cuantificación de metanol en las bebidas alcohólicas importadas por medio de la cromatografía de gases que es un método rápido, preciso y exacto que tiene un costo relativamente bajo y amplia aplicabilidad a las separaciones analíticas, además brinda información cuantitativa acerca de las especies que separa. Todo esto permitirá obtener datos reales sobre la concentración de metanol existente en las distintas bebidas alcohólicas importadas, de esta forma determinar si cumplen con las normas técnicas ecuatorianas INEN.[7]

6.4 Objetivos

General

- Verificar el contenido de metanol en Bebidas alcohólicas mediante la utilización de cromatografía de gases y el cumplimiento de las normativas técnicas ecuatorianas.

Específicos

- Preparar la muestra para establecer los parámetros físicos de las bebidas alcohólicas importadas por medio de la destilación.
- Cuantificar la concentración de metanol en las bebidas alcohólicas, por cromatografía de gases.
- Comparar los resultados obtenidos de la cuantificación de metanol en las bebidas alcohólicas nacionales e importadas, con los límites máximos permitidos indicados en las normas técnicas ecuatorianas INEN

6.5. Análisis de Factibilidad

El estudio ha desarrollarse es de tipo investigativo y tecnológico, ya que con ello se puede implementar un método confiable para verificar si las bebidas alcohólicas cumplen con los parámetros establecidas según la normativa técnica del Ecuador.

Este análisis de factibilidad es de carácter económico, porque se podrá valorar el grado de concentración de bebidas alcohólicas importadas a bajo costo, constituyendo un aporte valioso para la evaluación de la calidad de las bebidas alcohólicas.

El conocer la calidad de las bebidas alcohólicas se convertirá en una excelente alternativa para el control de calidad de la comercialización de este tipo de productos.

Tabla 6-1 Recursos Económicos Estimados para la Propuesta Planteada

Recursos humanos	UTA	GRADUANDO
Tutor	1000	
Egresado		
Recursos físicos		
Materia prima	1800	
Reactivos	1200	
Material de escritorio	400	
Recursos económicos		
Transporte		250
Imprevistos		200
Publicaciones		150
Subtotal		
	Total	5000

David Luna

6.6 Fundamentación

La cromatografía de gases es una técnica de separación analítica que ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios en los años 50, se la utiliza en la resolución de diversos problemas en la industria, en la medicina, en la biología y en el análisis ambiental, convirtiéndose en la actualidad como una herramienta para el control en una gran variedad de áreas. [8]

Aunque muchos productores de alcohol tienen ciertas obligaciones con respecto a la salud pública (por ej. control de calidad, advertencias para la salud), sus metas principales muchas veces se contraponen con ella. De particular preocupación es la globalización del mercado del alcohol, donde las compañías buscan ampliar sus mercados y por consiguiente que haya una mayor disponibilidad y consumo de alcohol. [1],

Para evitar indeseados problemas de intoxicación por metanol como ya ocurrió en el Ecuador en el mes de Julio del año 2011 es necesario tener un

control riguroso en la calidad de las bebidas expendidas en el mercado, tanto la nacionales con las importadas, lamentablemente no existe base de datos alguna que permita tener una idea de los licores importados y su respectivo certificado de calidad nacional, sino simplemente la idea de que si viene de afuera es bueno, sin pensar en si cumplen o no con los requerimientos técnicos requeridos por el organismo de control local.

6.7. Metodología. Modelo Operativo

Tabla 6-2 Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsable	Recursos	Pres.	Tiempo
Formulación de la propuesta	Verificación de la concentración de metanol en las bebidas alcohólicas	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$800	2 meses
Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta	Obtención de Materia prima Extracción del analito de estudio. Fijación de la concentración de metanol	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 3750	3 meses
Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Aplicación de la técnica de cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama para cuantificar la concentración de metanol en bebidas alcohólicas.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 1500	2 meses

Evaluación de la propuesta	Comparación de los datos obtenidos	Comprobación de los resultados obtenidos comparados con los de las normas técnicas ecuatorianas INEN	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 1200	2 meses
-----------------------------------	------------------------------------	--	--------------	-----------------------------------	---------	---------

David Luna

6.8. Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Dr. Roman Rodríguez y Egdo. David Luna.

Tabla 6-3 Administración de la propuesta.

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Verificación del cumplimiento con las normativas técnicas ecuatorianas del contenido de metanol en Bebidas alcohólicas mediante la técnica de cromatografía de gases	Inexistencia de estudios realizados dentro del país que determinen la concentración de metanol en bebidas alcohólicas	Obtención de una base de datos confiables que permitan conocer la concentración de metanol en las distintas bebidas alcohólicas y la respectiva comparación con las normas técnicas ecuatorianas	Determinar de la concentración de metanol en las muestras de estudio. Realizar análisis comparativos entre las bebidas alcohólicas y las NTC-INEN.	Dr. Roman Rodríguez. Egdo. David Luna

David Luna.

6.9. Previsión de la Evaluación

Tabla 6- 4 Previsión de la Evaluación de la Propuesta

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Sector Científico.
¿Por qué evaluar?	Utilización de métodos analíticos confiables en la cuantificación de metanol en bebidas alcohólicas
¿Para qué evaluar?	Determinación de niveles de confiabilidad de la calidad de las bebidas alcohólicas
¿Qué evaluar?	Materia prima Tecnología empleada. Muestras de análisis. Resultados obtenidos
¿Quién evalúa?	Director del proyecto Tutor Calificadores
¿Cuándo evaluar?	El tiempo necesario desde las pruebas preliminares, hasta los análisis finales de comparación de resultados.
¿Cómo evaluar?	Mediante instrumentos de evaluación.
¿Con qué evaluar?	Experimentación. y Normativas Y comparación con las normativas técnicas ecuatorianas existentes

David Luna

Bibliografía.

[1]. Monteiro, Maristela G. 2007. Alcohol y salud pública en las Américas: un caso para la acción. Washington, D.C: OPS página 33, disponible en: www.paho.org/spanish/dd/pin/A&SP.pdf

[2]. Consumo de bebidas alcohólicas.

Accedido el 20/02/2012

<http://www.greenfacts.org/es/alcohol/l-2/02-alcohol-consumption.htm#1>

[3]. 50 muertes por metanol

Accedido el 21/02/2012

http://elcomercio.com/pais/muertes-metanol_0_547145479.html

[4]. Uribe, C. 1989. Manual de Toxicología Clínica. Editorial Temis. Página 85, 86.

[5]. Bazau Ángel. 1862. Estudios químicos para el descubrimiento de las adulteraciones de varias sustancias alimenticias. Numero 6 página 3.

[6]. ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO Capitulo industria de las bebidas Lance A. Ward Ginebra página 10

[7]. SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M. y HOLLER, F, James. 2005. Fundamentos de Química analítica. Octava edición. International Thomson Editores, S.A. Página 218, 979

[8]. Valcarcel M, Gomez A. 1988. Técnicas analíticas de separación editorial Reverté S.A. Barcelona España página 615.

[9]. MAROTO, Alicia. 2002. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Página 24

- [10] Morrison y Boyd. 1990 Química orgánica 5ta edición Addison – Wesley Iberoamericana, S.A. USA página 629.
- [11] Merck Co. Inc. Rahway. The Merck Index. 1983 13ª. Edición., NJ, USA. 1463 página 853.
- [12] Primo Yúfera Eduardo. 1996. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, Volumen 1 editorial reverté. página 337.
- [13] Rodríguez R. Uribe M. Obtención de metanol propiedades usos editorial universidad tecnológica nacional Buenos Aires Argentina página 4, disponible en:
http://www.edutecne.utn.edu.ar/procesos_fisicoquimicos/Obtencion_de_Metano I.pdf
- [14] Riesgo Químico - Accidentes Graves Metanol Región de Murcia Consejería de Sanidad Dirección General de Salud Pública Servicio de Sanidad Ambiental 2007. Disponible en: www.murciasalud.es/archivo.php?id=99967
- [15] Sánchez L. 2005. Determinación de metanol en bebidas alcohólicas fermentadas tradicionales y populares de mayor consumo en dos regiones de la república de Guatemala por cromatografía de gases.
Tesis de Grado. Universidad de San Carlos De Guatemala Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacia
- [16] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 362, 1992 – 07
- [17] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 368 1978 – 05
- [18] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 1837. 1997 – 07
- [19] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 366 año1987-07
- [20] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 363 1992-07.

- [21] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 372 año 1987-07.
- [22] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 374 año 1987-07.
- [23] Norma Técnica ecuatoriana NTE-INEN 374 año 1987-07.
- [24] HARRIS, Daniel. 2007. Análisis Químico Cuantitativo. Grupo editorial Iberoamérica. Volumen 1. Página 637
- [25] CASTELLUCCI, Federico. 2005. Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Simposio sobre armonización de sistemas de garantía de calidad para laboratorios analíticos. oiv: Organisation internationale de la vigne et du vin
- [26] Norma INEN ISO/IEC 17025. 2002
- [27] FDA. 2000. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. /Center for Drug Evaluation and Research.
- [28] Crubellati R. ,[et.al.]. 2009. Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas / - 1a ed. - Buenos Aires : Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED, 2009. Páginas 20, 21, 5
- [29] Skoog, Holler, Nieman, 2001. Principios de análisis instrumental 5 edición, editorial Mc Graw Hill/ Interamericana de España S.A.U. página 12.
- [30] Laboratorios Ambientales. 2009. Directrices para la Acreditación, organismo de uruguayo de acreditación, DINAMA, página 24.
- [31] Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, (2002)].

[32] HARVEY, David. 2002. Química Analítica Moderna. Editorial McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid-España. 542pgs.

[33] Alma, conocimiento, Ética

Accedido el 23/02/2012

<http://www.biografiasyvidas.com/monografia/aristoteles/filosofia.htm>

[34] Ética

Accedido el 23/02/2012

http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%89tica#Edad_Contempor.C3.A1nea

[35] Constitución de la republica del Ecuador. 2008

ANEXOS A

Tablas de resultados

Tabla A-1 Relación de áreas de metanol (A1) con n-butanol (A2) A1/A2

Tratamientos	Relación de áreas A1/A2			Promedio
	R1	R2	R3	
T1(a0b0)	0	0	0	0,0000
T2(a0b1)	0	0	0	0,0000
T3(a1b1)	0,0128	0,0116	0,0125	0,0123
T4(a1b2)	0,0116	0,0104	0,0114	0,0111
T5(a2b1)	0,0252	0,0246	0,0254	0,0251
T6(a2b2)	0,0259	0,026	0,025	0,0256
T7(a3b1)	0,1131	0,1112	0,12	0,1148
T8(a3b2)	0,1158	0,1235	0,1132	0,1175
T9(a4b1)	0,3166	0,3201	0,3145	0,3171
T10(a4b2)	0,3196	0,3111	0,3125	0,3144
T11(a5b1)	0,674	0,6599	0,6699	0,6679
T12(a5b2)	0,6698	0,66	0,6668	0,6655
T13(a6b2)	1,0885	1,0985	1,0835	1,0902
T14(a6b2)	1,1029	1,1134	1,1045	1,1069

Elaborado por: David Luna

Factor A: Concentración mg/100ml.

Nivel a0: 0,00
 Nivel a1: 1,57
 Nivel a2: 3,15
 Nivel a3:15,74
 Nivel a4:47,21
 Nivel a5: 94,41
 Nivel a6:149,49

Factor B: Días

Nivel b1: Día 1.
 Nivel b2: Día 2.

R1, R2 y R3: Réplicas.

Parámetros para la validación:

Tabla A-2 Recuperación en porcentaje.

N.-	mg/100ml	Relación de Áreas A1/A2	Promedio Áreas	concentración de metanol mg/100ml (cromatógrafo)	% de Recuperación
1	0	0,0000			
2	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,000
3	0	0,0000			
4	1,57	0,0128			
5	1,57	0,0116	0,0124	2,3531	149,542
6	1,57	0,0128			
7	3,15	0,0252			
8	3,15	0,0259	0,0255	4,1515	131,915
9	3,15	0,0254			
10	15,74	0,1131			
11	15,74	0,1158	0,1138	16,2888	103,517
12	15,74	0,1126			
13	47,21	0,3166			
14	47,21	0,3196	0,3160	44,0567	93,328
15	47,21	0,3118			
16	94,41	0,6740			
17	94,41	0,6698	0,6679	92,3911	97,859
18	94,41	0,6598			
19	149,49	1,0885			
20	149,49	1,1029	1,0994	151,6699	101,461
21	149,49	1,1068			

Elaborado por: David Luna.

Ecuación de linealidad de la curva de calibración

$$\text{Concentración de metanol} \frac{\text{mg}}{100\text{ml}} = \left(\frac{\text{Área de metanol}}{\text{Área del } n - \text{butanol}} + a \right) * Fd$$

Tabla A-3 Curva de Calibración

[metanol]mg/100ml	Día 1 Relación de Áreas A1/A2	Día 2 Relación de Áreas A1/A2	Día 3 Relación de Áreas A1/A2
0,00	0	0	0
1,57	0,0128	0,0116	0,0128
3,15	0,0252	0,0259	0,0254
15,74	0,1131	0,1158	0,1126
47,21	0,3166	0,3196	0,3118
94,41	0,674	0,6698	0,6598
149,49	1,0885	1,1029	1,1068

Elaborado por: David Luna

Tabla A-4. Promedios de la curva de calibración

[metanol] mg/100ml	Relación de Áreas A1/A2
0,00	0,000
1,57	0,012
3,15	0,026
15,74	0,114
47,21	0,316
94,41	0,668
149,49	1,099

Elaborado por: David Luna

Material de Referencia

Tabla A- 5 Grado Alcohólico Brandy FAPAS

RÉPLICAS	Grado Alcohólico (°GL)
1	38,4
1	38,4
1	38,4
2	38,3
2	38,3
2	38,3
3	38,6
3	38,6
3	38,6

Elaborado por: David Luna

Tabla A-6 Relación de Áreas del Material de Referencia

FAPAS Brandy Concentración de metanol de 13,49mg/100ml de alcohol anhidro

CONC. mg/100ml FAPAS Brandy	Relación de áreas			mg/100ml de alcohol anhidro		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	0,037	0,035	0,0376	14,75	14,10	15,05
	0,034	0,037	0,0362	13,72	14,90	14,56
	0,034	0,037	0,0357	13,74	14,87	14,39

Elaborado por: David Luna

Tabla A-7 Concentración de metanol [mg/100ml] de muestras aleatorias de bebidas alcohólicas

Muestra	Grado alcohólico °GL	Concentración Metanol [mg/100ml]
1	14	4,6663
2	15	No detectado
3	16	19,4109
4	11	No detectado
5	11	10,5218
6	11	588,2127
7	38	224,2472
8	17	4,5133
9	17	39565,4561
10	13	No detectado

Elaborado por: David Luna

ANEXOS B

Análisis Estadístico

Curva de calibración

Volumen final de estándares: 50 ml (con disolución de etanol 40 GL)

Disolución de metanol al 10%: 7900 mg/100 cc)

Disolución de n_butanol (Estándar Interno) al 10%: 81 mg/100 cc (teórico)

Masa de 10 ml de metanol (99,9%)	7,8677
Masa de 10 ml de n_butanol (99,5%)	8,0557
Concentración de metanol al 10%	78,677
Concentración de n-butanol al 10%	80,557

Tabla B-1 Curva de calibración

V stock Butanol al 10% (µL)	V stock Metanol al 10% (µL)	[Metanol] (mg/100 cc)
500	0	0
500	10	1,57
500	20	3,15
500	100	15,74
500	300	47,21
500	600	94,41
500	950	149,49

Esta curva fue realizada en función de la norma AOAC Official Method 972.11, partiendo de una solución patrón y llevando a las distintas concentraciones indicadas en la tabla B-1.

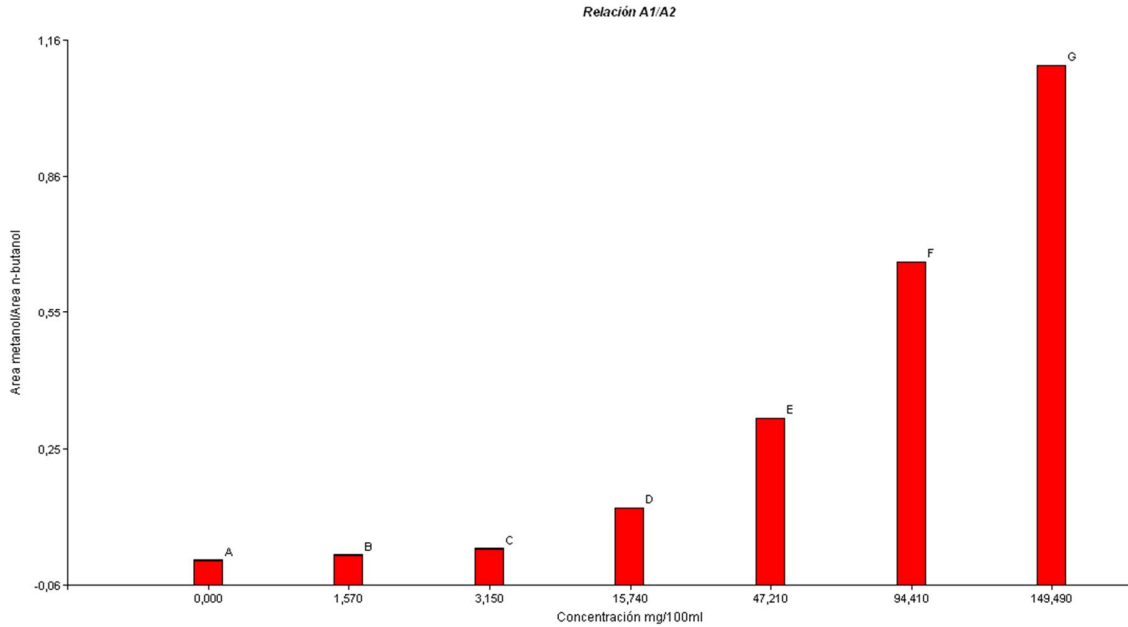
Tabla B-2 Análisis de varianza para la relación de áreas de la concentración de metanol A1 y n- butanol A2 (A1/A2).

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	6,37	14	0,45	52326,72	<0,0001	
Concentración mg/100ml	6,37	6	1,06	122094,01	<0,0001	
Dias	2,6E-07	1	2,6E-07	0,03	0,8642	
Replicas	8,4E-06	1	8,4E-06	0,96	0,3354	5,5E-04
Concentración mg/100ml*Dia..	7,9E-05	6	1,3E-05	1,51	0,2126	
Error	2,3E-04	27	8,7E-06			
Total	6,37	41				

Elaborado por: David Luna

Gráfico B-1. Factores principales para la relación a1/a2



Elaborado por David luna.

Tabla B-3 Análisis de Tukey para diferencias significativas.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00884

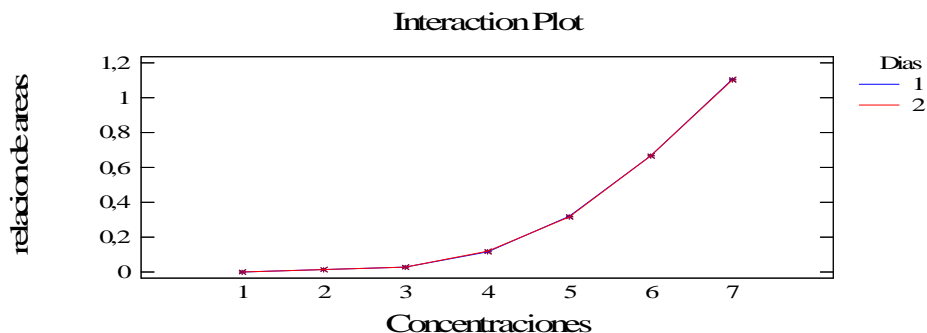
Error: 0,0000 gl: 27

Concentración mg/100ml	Dias	Medias	n	E.E.	
0,000	2,00	0,00	3	1,7E-03	A
0,000	1,00	0,00	3	1,7E-03	A
1,570	2,00	0,01	3	1,7E-03	B
1,570	1,00	0,01	3	1,7E-03	B
3,150	1,00	0,02	3	1,7E-03	C
3,150	2,00	0,03	3	1,7E-03	C
15,740	1,00	0,11	3	1,7E-03	D
15,740	2,00	0,12	3	1,7E-03	D
47,210	2,00	0,32	3	1,7E-03	E
47,210	1,00	0,32	3	1,7E-03	E
94,410	2,00	0,67	3	1,7E-03	F
94,410	1,00	0,67	3	1,7E-03	F
149,490	2,00	1,10	3	1,7E-03	G
149,490	1,00	1,11	3	1,7E-03	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

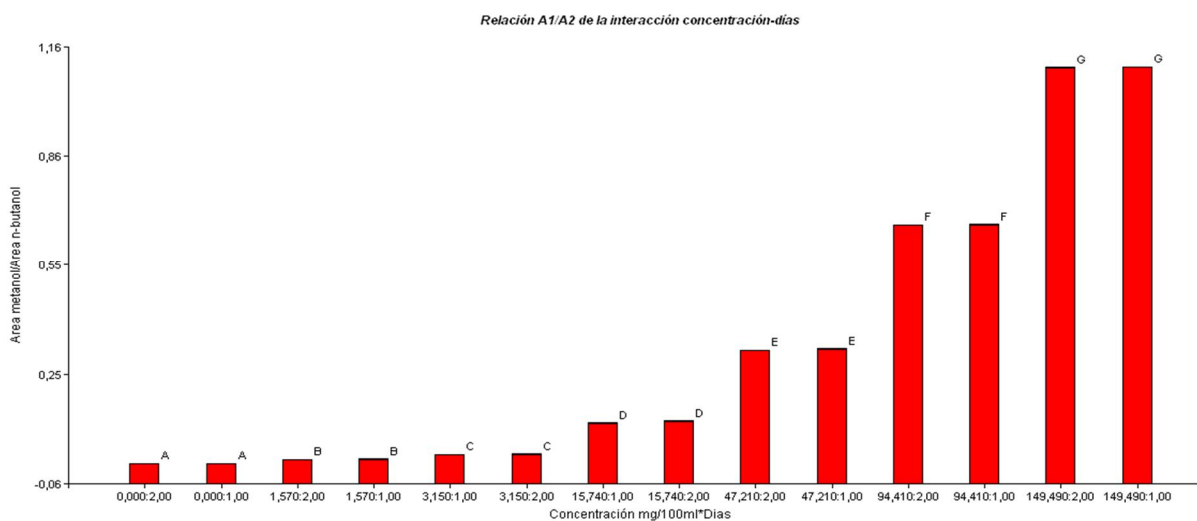
Elaborado por David luna.

Gráfico B-2. Interacciones de la relación de áreas y las concentraciones



Elaborado por David luna.

Gráfico B-3 Interacciones de los factores relación A1/A2.



Elaborado por David luna.

Tabla B-4 Límites de confianza

Límites de confianza de la pendiente:

$$LC_b = b \pm tS_b$$

$$LC_b = 0,0073 \pm (2,57 * 0,0001)$$

$$LC_b = 0,0073 \pm 0,00027$$

Límites de confianza de la ordenada al origen:

$$LC_a = a \pm tS_a$$

$$LC_a = -0,0047 \pm (2,57 * 0,0074)$$

$$LC_a = -0,0047 \pm 0,0019$$

Elaborado por: David Luna

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

Sensibilidad de calibrado:

$$\text{Pendiente } b = 0,0073$$

Sensibilidad Analítica:

$$\gamma = \frac{Ss}{m} * Fc$$

$$\gamma = \frac{0,0014}{0,0073} * 0,05$$

$$\gamma = 0,0195$$

DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Límite de Detección:

$$LOD = \frac{S y/x}{m} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (Xi - \bar{X})^2}}$$

$$LOQ = \frac{0,0014}{0,0073} * \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{7} + \frac{(44,509)^2}{19881,09}}$$

$$LOD = 0,6519$$

Límite de Cuantificación:

$$LOQ = \frac{S y/x}{k} * m \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (Xi - \bar{X})^2}}$$

$$LOQ = \frac{0,028}{10} * 0,0073 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6} + \frac{(44,509)^2}{19881,09}}$$

$$LOQ = 4,40E-06$$

Corrida Material de referencia Brandy Fapas.

Tabla B-5 Prueba de hipótesis comparación con t de student Día 1.

Hypothesis Tests
Sample means = 13, 49 and 14,12
Sample standard deviations = 1,032 and 0, 59
Sample sizes = 1 and 3
95,0% confidence interval for difference between means: -0,63 +/- 2,93128 [-3,56128,2,30128]

Null Hypothesis: difference between means = 0,0
Alternative: not equal
Computed t statistic = -0,924739
P-Value = 0,452725
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0,05.
Elaborado por: David Luna

Tabla B-6 Prueba de hipótesis comparación con t de student Día 2.

Hypothesis Tests
Sample means = 13,49 and 14,67
Sample standard deviations = 1,032 and 0,45
Sample sizes = 1 and 3
95,0% confidence interval for difference between means: -1,18 +/- 2,23572 [-3,41572,1,05572]
Null Hypothesis: difference between means = 0,0
Alternative: not equal
Computed t statistic = -2,27091
P-Value = 0,151145
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0,05.
Elaborado por: David Luna

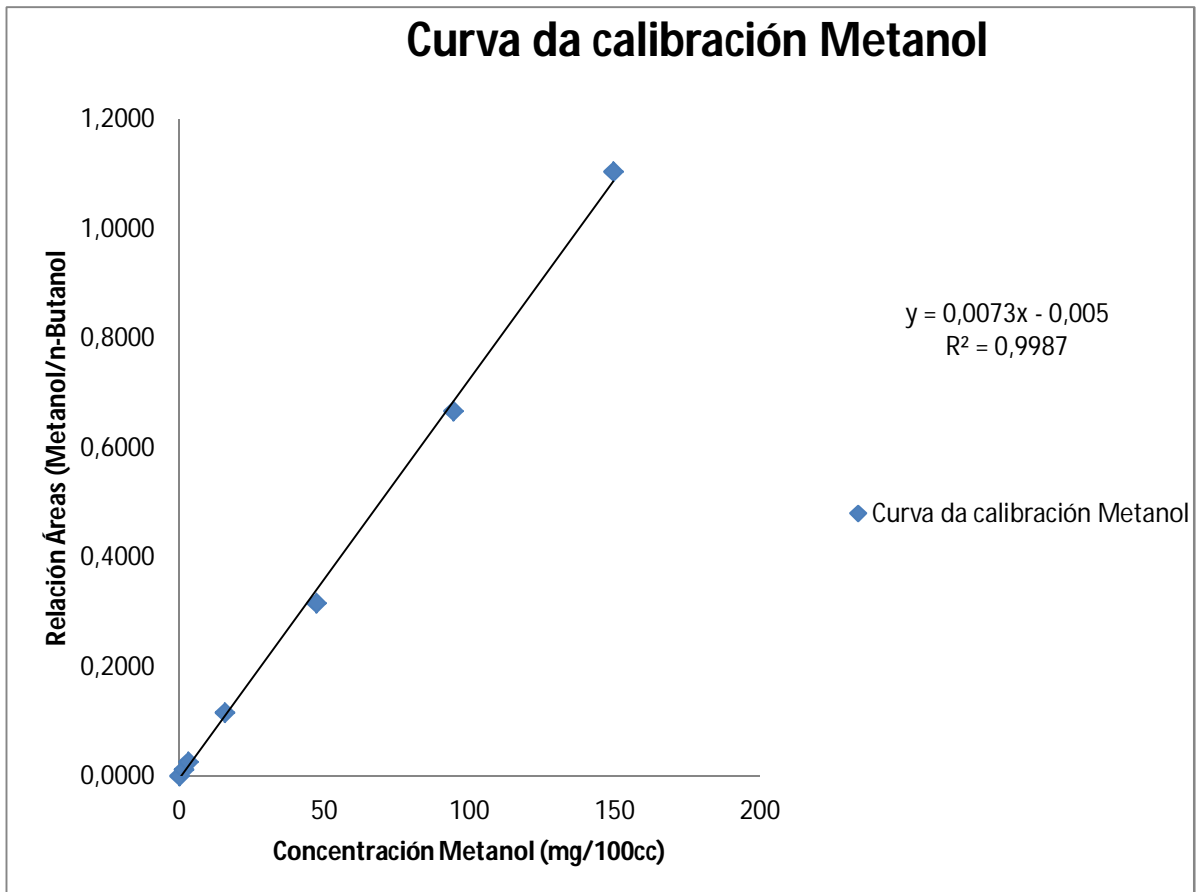
Tabla B-6 Prueba de hipótesis comparación con t de student Día 3.

Hypothesis Tests
Sample means = 13,49 and 14,71
Sample standard deviations = 1,032 and 0,34
Sample sizes = 100 and 100
95,0% confidence interval for difference between means: -1,22 +/- 0,214273 [-1,43427,-1,00573]
Null Hypothesis: difference between means = 0,0
Alternative: not equal
Computed t statistic = -11,228
P-Value = 1,55431E-14
Reject the null hypothesis for alpha = 0,05.
Elaborado por: David Luna

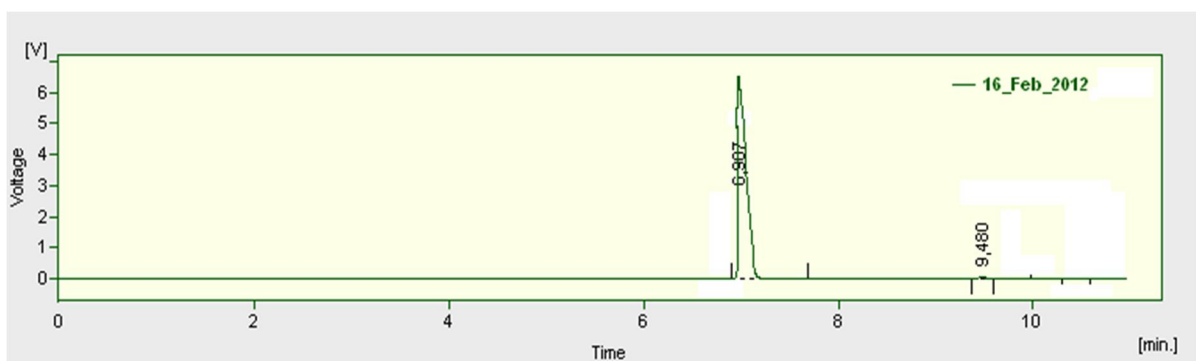
ANEXOS C

Gráficas

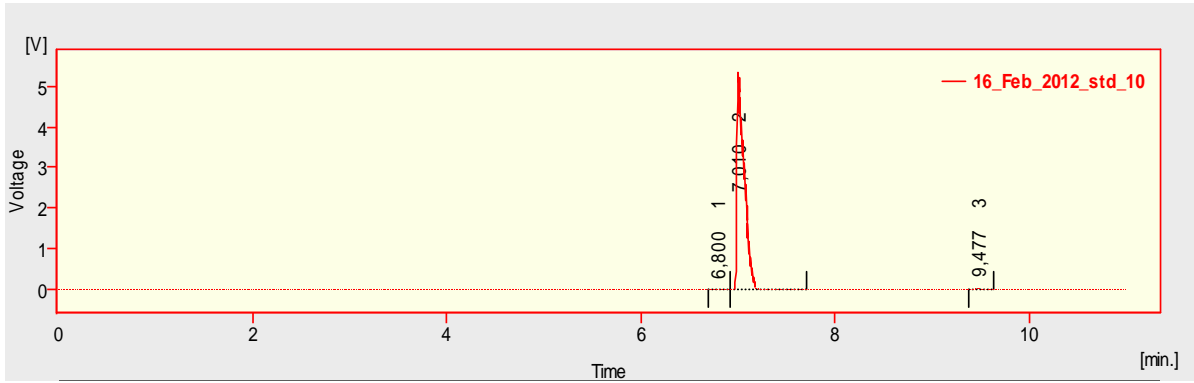
Gráfica C-1 Datos de la curva de calibración de metanol y la relación de áreas Metanol/n-Butanol.



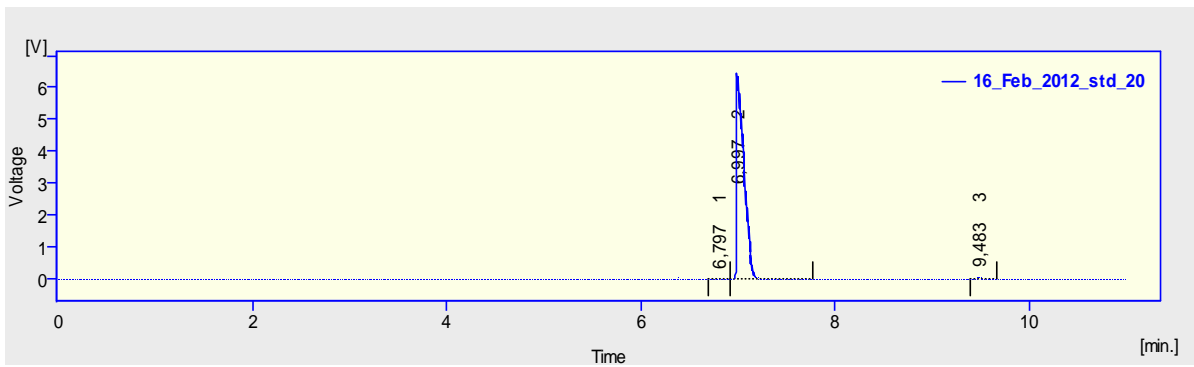
Gráfica C-2 Cromatogramas de Metanol a 0mg/100ml



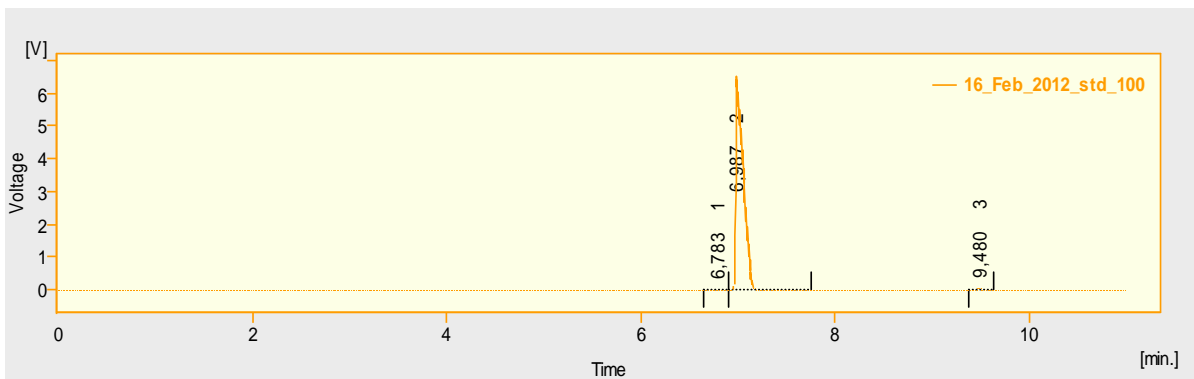
Gráfica C-3 Cromatogramas de Metanol a 1,570mg/100ml



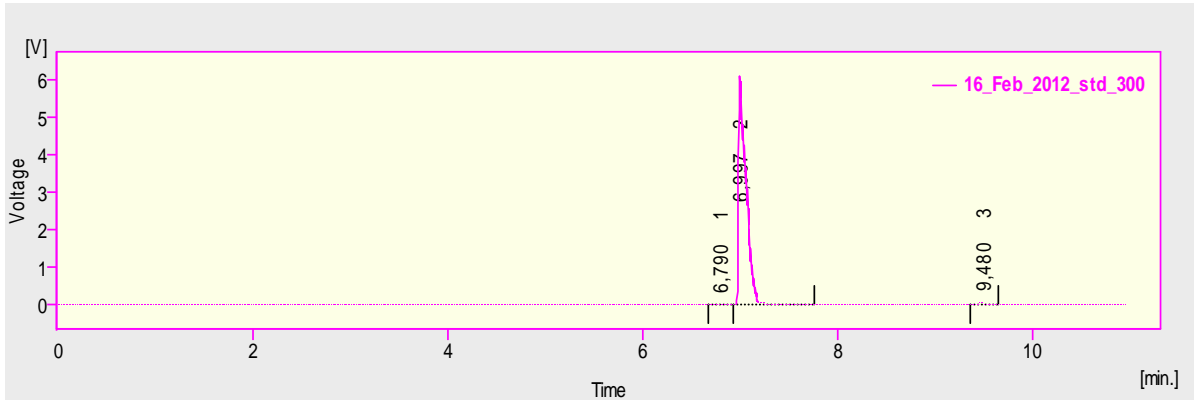
Gráfica C-4 Cromatogramas de Metanol a 3,150mg/100ml



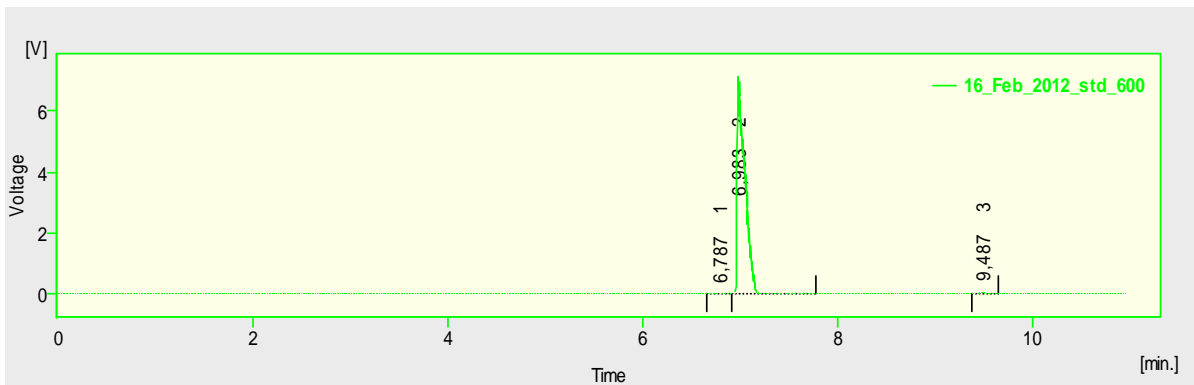
Gráfica C-5 Cromatogramas de Metanol a 15,74 0mg/100ml



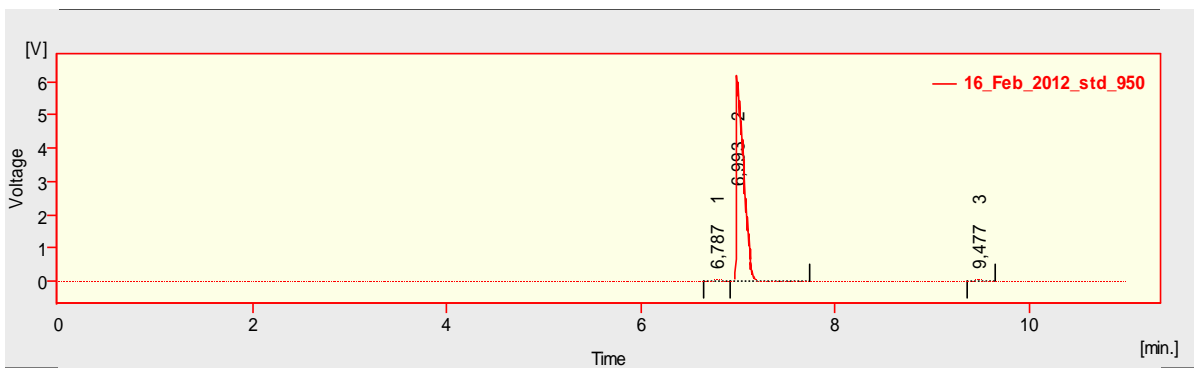
Gráfica C-6 Cromatogramas de Metanol a 47,210mg/100ml



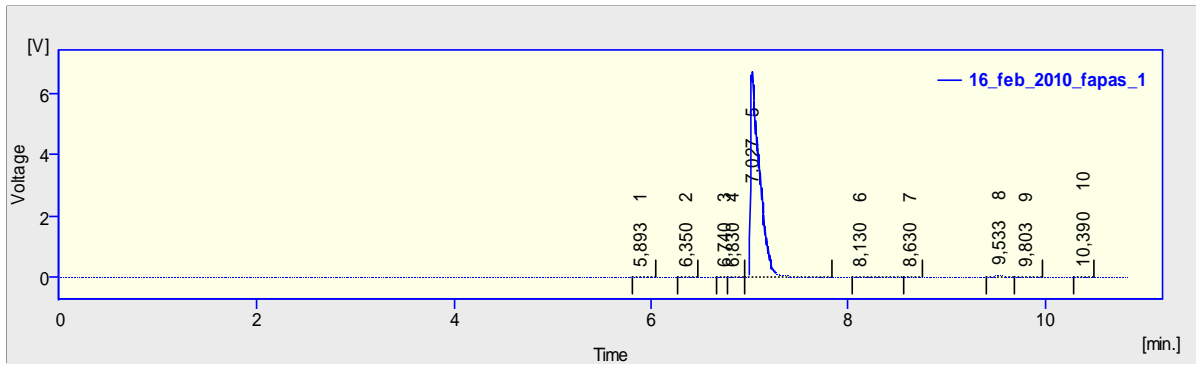
Gráfica C-7 Cromatogramas de Metanol a 94,10mg/100ml



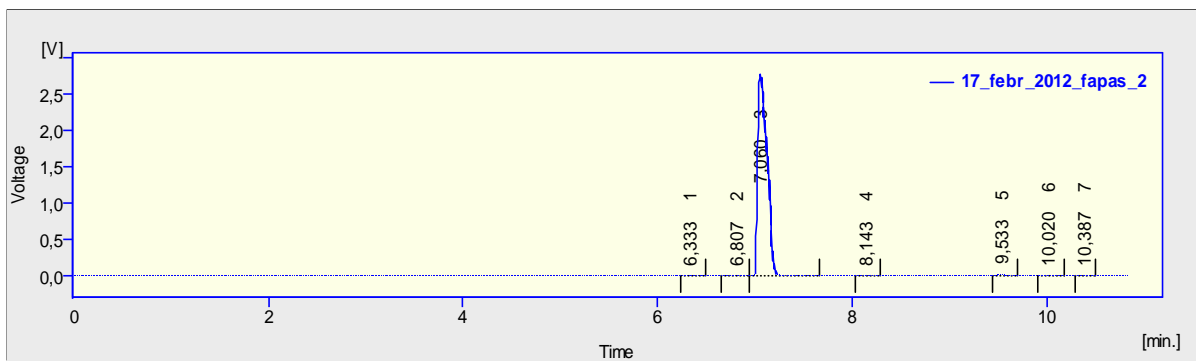
Gráfica C-8 Cromatogramas de Metanol a 149,490mg/100ml



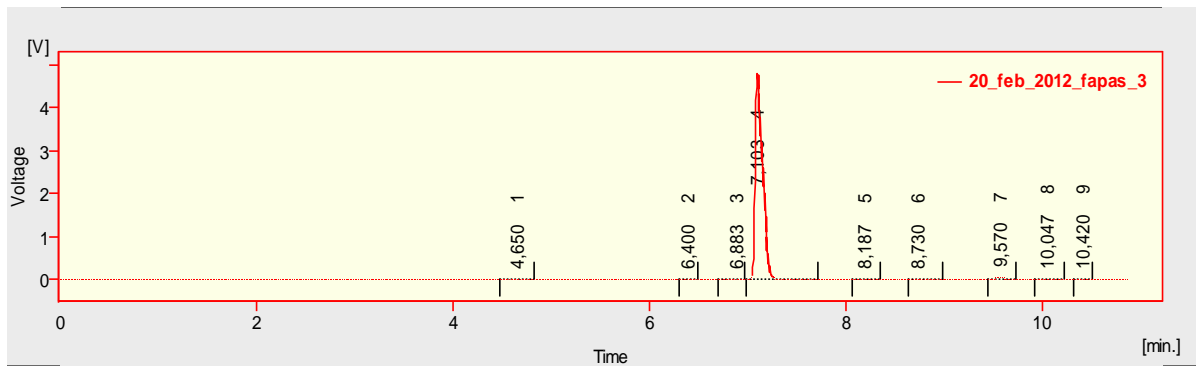
Gráfica C-9 Cromatogramas de Material referencia Día 1



Gráfica C-10 Cromatogramas de Material referencia Día 2



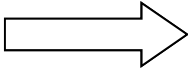
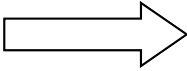
Gráfica C-11 Cromatogramas de Material referencia Día 1



ANEXOS D

Diagramas

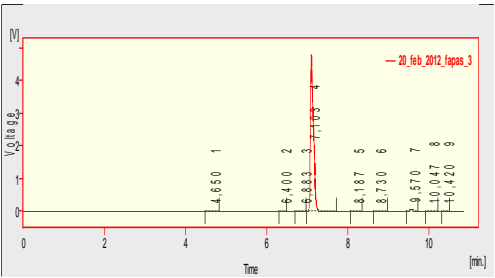
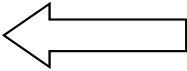
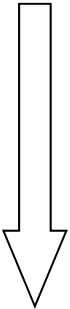
Diagrama D-1 Estandarización del metanol.



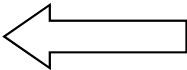
Grado
alcohólico

dy

titulación



a



Toma de
muestra

de
FID