

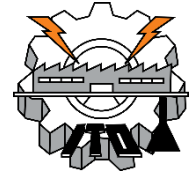


SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Oaxaca



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL:

“VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE METANOL Y ALCOHOLES SUPERIORES EN BASE A LA NORMA MEXICANA NMX-V-005-NORMEX-2018 PARA EL LABORATORIO DE CALIDAD DEL COMERCAM.”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ANTONIO ILESCAS FLORES

ASESOR:

M.C. JORGE MIGUEL MARTINEZ CANSECO

COMISIÓN REVISORA:

M.C. JAIME GALVÁN ESPINOZA

M.C. MARIO DÍAZ GONZÁLEZ

DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA

RESUMEN

La presente investigación que se llevó a cabo en el laboratorio del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), en base a la Norma Mexicana NMX-V-005-NORMEX-2018 para el desarrollo del proyecto con una finalidad que pudiera ser utilizado con el fin de acreditar el laboratorio de este consejo buscando la certificación del laboratorio de calidad ante la entidad encargada de estas certificaciones Entidad Mexicana de Acreditación (EMA).

Debido a la limitante de laboratorios certificados ante la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) en el estado de Oaxaca y con la propuesta del COMERCAM es tener su laboratorio acreditado con los métodos certificados, y en base a competitividad y la creciente demanda del consumo de productos procedentes de mezcal a nivel nacional e internacional, llevando a tener un control de calidad en productos de esta índole en función del contenido metanol y alcoholes superiores.

Al realizar esta investigación, se pondrá determinar los valores reales que pueden estar contenidos en los productos a analizar dentro de este tipo de productos y en alerta a las industrias nacionales, las autoridades de sanidad y a los consumidores, en cuanto a aumentar sus exigencias y realizar un control de calidad más profundo a este tipo de productos.

Es por ello que el Laboratorio de Calidad del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A.C. (COMERCAM A.C.), necesita de un método estandarizado que le permita la cuantificación de metanol y alcoholes superiores presentes en el Mezcal, usando el método de cromatografía de gases, utilizando un detector de llama (FID), y de esta forma proporcionar elementos que le permitan la validación del método en un futuro ante la entidad correspondiente para asegurar la confiabilidad de los resultados emitidos por este organismo.

CONTENIDO

RESUMEN	i
CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	x
OBJETIVO GENERAL	xii
OBJETIVOS ESPECIFICOS	xiii
JUSTIFICACIÓN	xiv
CAPITULO 1 MARCO TEORICO	1
1.1 AGAVE	1
1.1.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA	2
1.1.3 CLASIFICACIÓN	5
1.1.4 ORIGEN	7
1.2 CULTIVO Y USOS	9
1.2.1 ZONA GEOGRÁFICA	12
1.2.2 ANTECEDENTES	14
1.3 BEBIDAS ALCOHÓLICAS	16
1.3.1 TIPOS DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS	16
1.3.2 MEZCAL	17
1.3.3 REGIÓN DEL MEZCAL EN EL ESTADO DE OAXACA.	19
1.3.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL EN EL DISTRITO DE VALLES CENTRALES DE OAXACA	19
1.3.5 NORMATIVIDAD PARA EL MEZCAL	22
1.3.6 TIPOS Y CATEGORÍAS DE MEZCAL DEFINIDAS EN LA NOM-070-SCFI-2016	23
1.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES.	26
1.4.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA	27
1.4.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.	28

1.4.3 COLUMNA CROMATOGRÁFICA	38
1.4.4 FASE ESTACIONARIA	43
1.4.5 POLIETILENGLICOLAS	45
1.4.6 DETECTORES	45
1.4.7 ANÁLISIS CUANTITATIVOS:	48
1.4.8 CALIBRADO POR PATRONES:	48
1.4.9 SELECCIÓN, ELABORACIÓN Y NORMALIZACIÓN DEL MÉTODO.	50
1.4.10 EVALUACIÓN DE RESULTADOS ANALÍTICOS E INFORMES TÉCNICOS	53
1.5 FUNDAMENTO TEÓRICO	54
1.5.1 ALGUNOS ASPECTOS IMPORTANTES EN EL TRAZADO DE LAS LÍNEAS DE CALIBRADO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES.	56
1.5.1.1 Determinación del rango lineal.	57
1.5.1.2 Preparación de patrones.	58
1.5.1.3 Medición de la respuesta de los patrones.	59
1.5.2 Modelo lineal.	59
1.5.3 Estimación por mínimos cuadrados	62
1.5.3.1 Errores en la pendiente y ordenada en el origen de la recta de regresión	65
1.5.3.2 Región de confianza conjunta para β_0 y β_1 .	67
1.5.4 cálculo de una concentración y su error aleatorio	68
1.5.5 cálculo de las cifras de mérito.	71
1.5.5.1 Sensibilidad de la calibración.	71
1.5.5.2 Sensibilidad Analítica.	72
1.5.5.3 Límites de detección	73
1.5.5.3.1 Falsos positivos y falsos negativos	73
1.5.5.3.2 Expresiones para el cálculo del valor crítico y del límite de detección	76
1.5.5.4 Límite de cuantificación	78
1.5.5.5 Rango dinámico	79
1.5.5.6 Rango lineal	79
1.5.6 Método de las adiciones de estándar	80
1.5.6.1 Procedimiento	82
1.5.7 exactitud y comparación de dos métodos analíticos.	86
1.5.7.1 Exactitud de un método analítico.	86

1.5.7.1.1 Región de confianza cuando las varianzas son constantes.	88
1.5.7.1.2 Regresión ponderada	89
CAPITULO 2. DESARROLLO DEL TRABAJO	91
2.1 PROCEDIMIENTO	91
2.1.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA	91
2.1.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ACETALDEHÍDO	92
2.1.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO	92
2.1.4 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE CALIBRACIÓN	93
2.2 CONDICIONES DE OPERACIÓN	94
2.2.1 CÁLCULOS Y RESULTADOS	95
2.2.2 CÁLCULO DE RELACIÓN DE CONCENTRACIONES Y DE ÁREAS	95
2.3 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	96
2.3.1 REPETIBILIDAD	96
2.3.2 REPRODUCIBILIDAD	97
CAPITULO 3 RESULTADOS	99
3.1 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO METANOL	101
3.1.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	102
3.1.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL ANALITO METANOL	103
3.1.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DEL ANALITO METANOL	106
3.2 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO 2-BUTANOL	109
3.2.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	110
3.2.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	111
3.2.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	114
3.3 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO PROPANOL	117
3.3.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	118
3.3.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	119
3.3.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	122
3.4 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO ISOBUTANOL	125
3.4.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	126
3.4.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	127

3.4.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO _____	130
3.5 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO N-BUTANOL _____	133
3.5.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD _____	134
3.5.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD _____	135
3.5.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO _____	139
3.6 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO PENTANOL _____	142
3.6.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD _____	143
3.6.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD _____	144
3.6.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO _____	147
3.7 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO ISOAMÍLICO _____	150
3.7.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD _____	151
3.7.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD _____	152
3.7.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO _____	155
CONCLUSIÓN _____	158
BIBLIOGRAFÍA _____	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Variedad de Agaves Utilizados en la Elaboración del Mezcal _____	11
Tabla 2: Concentraciones recomendadas para la preparación de la(s) solución(es) concentrada(s). _____	91
Tabla 3: concentración de la(s) solución(es) de calibración _____	93
Tabla 4: Condiciones de Trabajo del cromatógrafo de gases _____	97
Tabla 5: Materiales Equipos Y Procedimientos _____	99
Tabla 6: Concentraciones de los Puntos Elaborados del Analito Metanol _____	101
Tabla 7: Estadísticos obtenidos del Analito Metanol _____	101
Tabla 8: Parámetros y Criterios de Aceptación de los Estadísticos del Analito Metanol _____	102
Tabla 9: Inyecciones realizada en los días 1 y 2 del Analito Metanol _____	103
Tabla 10: Concentraciones de los puntos Elaborados del Analito 2-Butanol _____	109
Tabla 11: Estadísticos obtenidos del Analito 2-Butanol _____	109
Tabla 12: Parámetros y Criterios de Aceptación de los Estadísticos del Analito 2-Butanol _____	110
Tabla 13: Inyecciones realizadas en los días 1 y 2 del Analito 2-BUTANOL _____	111
Tabla 14: Concentraciones de los Puntos Elaborados del Analito Propanol _____	117
Tabla 15: Estadísticos Obtenidos del Analito Propanol _____	117
Tabla 16: Parámetros y Criterios de Aceptación de los Estadísticos del Analito Propanol _____	118
Tabla 17: Inyecciones realizadas en los días 1 y 2 del Analito Propanol _____	119
Tabla 18: Concentraciones de los Puntos Elaborados del Analito Isobutanol _____	125
Tabla 19: Estadísticos Obtenidos del Analito Isobutanol _____	125
Tabla 20: Parámetros y Criterios de Aceptación De los Estadísticos del Analito Isobutanol _____	126
Tabla 21: Inyecciones Realizadas en los Días 1 y 2 del Analito Isobutanol _____	127
Tabla 22: Concentraciones de los Puntos Elaborados del Analito N-Butanol _____	133
Tabla 23: Estadísticos Obtenidos del Analito N-Butanol _____	133
Tabla 24: Parámetros y Criterios de Aceptación de los Estadísticos del Analito N-Butanol _____	134

Tabla 25: Inyecciones Realizadas en los días 1 y 2 del Analito N-Butanol _____	135
Tabla 26: Concentraciones de los Puntos Elaborados del Analito Pentanol _____	142
Tabla 27: Estadístico Obtenido del Analito Pentanol _____	142
Tabla 28: Parámetros y Criterios de Aceptación de los Estadísticos del Analito Pentanol _____	143
Tabla 29: Inyecciones Realizadas en los días 1 y 2 del Analito Pentanol _____	144
Tabla 30: Concentraciones de los Puntos Elaborados del Analito Isoamílico _____	150
Tabla 31: Estadísticos Obtenidos del Analito Isoamílico _____	150
Tabla 32: Parámetros Y criterios de Aceptación de los Estadísticos del Analito Isoamílico _____	151
Tabla 33: Inyecciones Realizadas en los Días 1 y 2 del Analito Isoamílico _____	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Agave lyobaa</i> García-Mend. & S. _____	5
Figura 2: <i>Agave Angustifolia</i> Haw _____	12
Figura 3: <i>Agave Potatorum</i> _____	12
Figura 4: <i>Agave Rhodacantha</i> _____	12
Figura 5: <i>Agave Marmorata</i> _____	12
Figura 6: <i>Agave Karwinskii</i> _____	12
Figura 7: Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases _____	30
Figura 8: Curvas de AEPT para tres gases portadores de uso habitual _____	31
Figura 9: Esquema de un inyector para columnas empaquetadas _____	33
Figura 10: Esquema de un inyector de “split” _____	35
Figura 11: Esquema de un inyector “on-column” _____	38
Figura 12: Sistemas de inyección de espacio de cabeza _____	40
Figura 13: Columnas empaquetadas para cromatografía de gases _____	41
Figura 14: Tipos de columna tubulares abiertas. _____	42
Figura 15: Detector de ionización de llama característico _____	48
Figura 16. Modelo de calibración de Eq. (1), asumiendo que la señal registrada proviene de la distribución normal _____	61
Figura 17: Ilustración del método de mínimos cuadrados: la recta de calibración ajustada es la que minimiza la suma de cuadrados de todas las distancias verticales e_i . _____	63
Figura 18: Comparación de ϵ_i con el residuo e_i . _____	64
Figura 19. Distribución alrededor de cero y nivel crítico _____	74
Figura 20. Nivel crítico de límite de detección para una probabilidad A. El riesgo de cometer un falso negativo es del 50% _____	75
Figura 21. Nivel crítico de límite de detección para A=B _____	76
Figura 22. Representación grafica de las decisiones tomadas en función de la concentración (Currie 1968). _____	78
Figura 23. Rango dinámico y lineal de un método analítico. _____	80
Figura 24. Curvas de calibrado del perclorato en agua pura y en agua subterránea (Harris 2016). _____	81

Figura 25. Análisis aplicando el método de adiciones de estándar. Inicialmente en cada matraz añade el mismo volumen de muestra (5mL). se adicionan 0, 5, 10, 15, 20 mL de estándar. se afora a volumen final (por ejemplo 50 mL).	82
Figura 26 Valores Residuales del Analito Metanol	102
Figura 27 Diagrama de Ishikawa del Analito Metanol	106
Figura 28 Gráfico de Contribuciones en el Analito Metanol	108
Figura 29: Linealidad del Analito 2-Butanol	110
Figura 30: Valores Residuales del Analito 2-Butanol	110
Figura 31: Gráfico de Contribuciones del Analito 2-Butanol	116
Figura 32: Linealidad del Analito Propanol	118
Figura 33: Valores Residuales del Analito Propanol	118
Figura 34: Diagrama de Ishikawa del Analito Propanol	123
Figura 35: Gráfico de Contribuciones del Analito Propanol	124
Figura 36: Linealidad del Analito Isobutanol	126
Figura 37: Valores Residuales del Analito Isobutanol	126
Figura 38: Diagrama de Ishikawa del Analito Isobutanol	130
Figura 39: Gráfico de Contribuciones del Analito Isobutanol	132
Figura 40: Linealidad del Analito N-Butanol	134
Figura 41: Valores Residuales del Analito N-Butanol	134
Figura 42: Diagrama de Ishikawa del Analito N-Butanol	139
Figura 43: Gráfico de Contribuciones del Analito N-Butanol	141
Figura 44: Linealidad del Analito Pentanol	143
Figura 45: Valores Residuales del Analito Pentanol	143
Figura 46: Diagrama de Ishikawa del Analito Pentanol	147
Figura 47: Gráfico de Contribuciones del Analito Pentanol	149
Figura 48: Linealidad del Analito Isoamílico	151
Figura 49: Valores Residuales del Analito Isoamílico	151
Figura 50: Diagrama de Ishikawa del Analito Isoamílico	155
Figura 51: Gráfico de Concentración del Analito Isoamílico	157

INTRODUCCIÓN

Actualmente y debido al cambio de administración en manos del Director actual Abelino Cohetero, se busca llevar a cabo una actualización y remodelación en el sistema de procesos y equipo con los que cuenta actualmente el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) y tomando a consideración de los laboratorios que existen en la entidad de Oaxaca los cuales son dos niza navani y extracta, por la problemática de la demanda por parte de los socios y realizar este tipo de análisis fuera del estado tiene un costo más elevado para los productores.

Con este trabajo se busca la validación de la metodología para la determinación de metanol y alcoholes superiores en base a la norma mexicana NMX-V-005-NORMEX-2018 para el laboratorio de calidad del COMERCAM con la finalidad de que en un proceso de acreditación le permita cumplir con los parámetros fijados por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). así también como la Cooperación Internacional De Acreditación De Laboratorios (ILAC) por medio de propuestas mejora continua, debido a que en todo momento es necesario la mejora continua dentro de alguna organización o empresa.

La producción de bebidas alcohólicas a nivel industrial y artesanal, es el de mayor demanda y consumo a nivel mundial, día a día se incrementan los consumidores de este tipo de bebidas, desde las no destiladas como la cerveza, hasta las destiladas como el mezcal (donde el contenido alcohólico es elevado).

El consumo masivo y la generación de ingresos de este tipo de industria, ha provocado que en muchos lugares del mundo, se elabore de forma casera, bebidas con alto grado alcohólico a bajo precio, sin cumplir con las normas establecidas, creando una serie de complicaciones que van desde financieras y legales, hasta los de salud, ya que al no producirse dentro de industrias confiables que cuentan con estándares de calidad, se elaboran productos que ponen en riesgo la salud y la vida de las personas que las consumen, por la presencia de metanol, alcoholes

superiores, ésteres entre otros compuestos producidos durante la fermentación alcohólica, los cuales son producidos durante la fermentación siendo sustancias indeseables o como producto adulterante a través de mezclas frías, estando presentes como congéneres del etanol. Debido a la toxicidad que presentan estas sustancias, no debe encontrarse en el consumo humano de forma pura o en grandes cantidades, ya que puede provocar intoxicaciones que pueden ir desde la ceguera permanente hasta cianosis, hipotensión, coma y en el peor de los casos muerte por insuficiencia respiratoria.

Para poder determinar cuantitativamente el contenido de estos alcoholes y otro tipo de componentes se utiliza la cromatografía de gases, que es un método instrumental el cual es utilizado en diferentes industrias, como parte del control de algunas industrias tales como las industrias controladoras del medio ambiente, control de hidrocarburos, análisis de pesticidas, etc. y en este caso en especial nos ayudará a desarrollar el método para la cuantificación de metanol y alcoholes superiores presentes dentro de las mezclas hidroalcohólicas a examinar.

OBJETIVO GENERAL

Validar la metodología para la determinación de metanol y alcoholes superiores en base a la norma NMX-V-005-NORMEX-2018 por cromatografía de gases para el Laboratorio de calidad COMERCAM.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la curva de calibración estandarizada, los límites de detección y de cuantificación, necesarios para la validación de un método.
- Estandarizar la curva de calibración, los límites de detección y de cuantificación, necesarios para la validación de un método
- Determinar los parámetros de desempeño para la verificación del método para cada una de las sustancias.
- Evaluar los siguientes parámetros de desempeño para la verificación del método:
 - a) Linealidad
 - b) Intervalo de Trabajo
 - c) Límite de cuantificación
 - d) Repetibilidad
 - e) Precisión intermedia
 - f) Recuperación
 - g) Sesgo
 - h) Incertidumbre

JUSTIFICACIÓN

El Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), actualmente dentro de sus programas a implementar busca que los métodos establecidos ante las normas NMX-EC-17025-IMNC-2018, NMX-V-005-NORMEX-2018, para el uso, manejo y certificación ante la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) del cromatógrafo de gases del laboratorio de calidad.

Con la finalidad de mejorar la implementación del área de recepción de muestras para la atención de los socios del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), y así teniendo un mejor servicio de recepción y organización dentro del laboratorio de calidad con lo que se mejora la línea de análisis de estos para los procesos tales como Azúcares Reductores Totales (ART), Cromatografía de Gases siendo estos los beneficios para la implementación de la acreditación del laboratorio de calidad ante la entidad correspondiente ya que no cuentan con este servicio actualmente dentro del organismo.

CAPITULO 1 MARCO TEORICO

1.1 AGAVE

Los agaves en México son uno de los símbolos de nuestra cultura, tradiciones y costumbres. Pertenecen al grupo de plantas que nos representan, pues de la especie *Agave tequilana* Weber se obtiene el tequila, una de las bebidas que nos caracteriza como mexicanos el cual es hasta su definición un fermentado de agave (Mezcal) aunque solo con una zona geográfica distinta (Guadalajara). Es común encontrarse a estas plantas en jardines, parques, avenidas o a un lado del camino cuando se viaja por carretera. Se ha reportado que en México existen aproximadamente 330 especies de agave.

Los Agaves son plantas que pertenece a la familia *Agavaceae*, debido a sus largos ciclos biológicos (7 a 12 años), son plantas multianuales que forman parte del paisaje natural y rural de las poblaciones donde crecen. Estas plantas son aprovechables antes de la floración; por lo tanto, se inhibe la reproducción sexual cortando el eje floral, para asegurar que en el tallo y la base de las hojas se almacenen los polisacáridos (Díaz, 2000).

Las especies de agave también son conocidas por sus usos. Entre ellos destacan la fabricación de canastas, sacos, cordeles, entre otros, a partir de la fibra de especies como *Agave fourcroydes* Lem., *Agave sisalana* Perrine, y el Híbrido H11648 (*Agave angustifolia* Haw. x *Agave amaniensis* Trel. & W. Nowell) x *Agave angustifolia*. También son empleados para la elaboración de bebidas alcohólicas como el tequila que se produce a partir de *A. tequilana* Weber var. (forma) azul o los mezcales a partir de *Agave rhodacantha* Trel. o *Agave potatorum* Zucc.; de igual manera, se han empleado en la medicina tradicional pues de *A. fourcroydes* se han identificado sapogeninas esteroideas con propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias o hemolíticas; otro producto obtenido a partir de *A. tequilana* es la miel de agave que puede ser empleada como un sustituto de azúcar; y por último, son por excelencia plantas de ornato y en este contexto, se ha reportado que en México existen

aproximadamente 330 especies de agave, muchos de los cuales poseen gran potencial hortícola que ha sido fundamentalmente subexplotado. Debido a esta extensa variedad de productos obtenidos a partir de estas especies, es importante preservarlas para continuar disfrutando de ellas.

La conservación de la reserva genética (ADN) es necesaria para la subsistencia de las plantas pues en ellas se encuentra la información para el desarrollo de la planta, la morfología, el apoyo para combatir enfermedades o plagas, el ciclo de vida y las futuras adaptaciones a condiciones climáticas distintas, además de que es necesario que exista una variación genética para que posean capacidad evolutiva. Para ayudar a la conservación de los agaves uno de los puntos indispensables es generar la información sobre la organización y composición de su genoma. Se sabe que estas especies contienen 7.5 pg (haploide) de ADN, que su número básico cromosómico es $n=30$ y que existen especies poliploides, es decir, con juegos extras de cromosomas. Sin embargo, aún se tiene mucho que explorar en los genomas de estas especies.

1.1.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

Los agaves o magueyes son plantas xerófitas y presentan modificaciones o especializaciones morfológicas como una estrategia para sobrevivir en ambientes desérticos, áridos o secos. Son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, esta estructura permite que el agua en forma de lluvia o de rocío sea captura y dirigida hacia el suelo y las raíces; el tallo es el principal órgano de almacenamiento de agua y carbohidratos de reserva. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas y carnosas, su forma varía de linear a lanceolada u ovalada, y los márgenes exhiben una gran diversidad morfológica pero casi siempre tienen una espina al final del ápice. Las hojas le permiten el almacenamiento de agua y están asociadas a otras adaptaciones como una cutícula gruesa, la acumulación de cera y la presencia de estomas complejos que las protegen y evitan la pérdida de agua. Además, presentan sistemas de raíces superficiales que permiten la captación eficiente de pequeñas cantidades de agua y

presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas, en el que el CO₂ se almacena en forma de ácidos orgánicos en la vacuola y durante el día, éste se incorpora a la fotosíntesis, por lo tanto, la transpiración es menor y da como resultado ganancias en carbono perdiendo lo mínimo en agua.

Hasta el momento no se cuenta con una clasificación para todas las especies del género *Agave*. El único trabajo reportado en el que se clasificaron las especies de Norteamérica es el realizado por Gentry en 1982, en dicho trabajo propuso una clasificación a partir de las características morfológicas de la inflorescencia; clasificó dos subgéneros que denominó *Littaea* y *Agave*. A su vez, estos subgéneros se encuentran divididos en secciones, el subgénero *Littaea* tiene ocho secciones con aproximadamente 54 especies y el subgénero *Agave* cuenta con doce secciones con aproximadamente 136 especies. Sin embargo, es necesario seguir generando información que permita actualizar esta clasificación. A pesar de la gran importancia que implican los agaves en México son pocos los grupos de investigación que apoyan con la generación y búsqueda de información. Es importante juntar esfuerzos para el estudio y comprensión de cómo los factores ambientales, la carga genética, el uso de estas especies, qué propicia la generación de especies con diferentes niveles de ploidía y muchas otras preguntas que hacen que estas especies sean muy interesantes.

Los agaves son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto (en este caso llega a medir hasta tres metros de altura); en varias especies el tallo se dobla hacia el sustrato y reptar sobre el suelo o las rocas por lo que es difícil observarlo, ya que pueden surgir rosetas a lo largo y, además quedar cubiertos por las hojas secas. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa; su forma varía de linear a lanceolada u ovada; las de las especies más pequeñas no sobrepasan veinte gramos de peso, mientras que las de los magueyes pulqueros son las más grandes del género, llegando a pesar más de treinta kilos cada una. El número de

hojas varía, de cinco a diez en *Agave Gypsophila* y *Agave Nizandensis*, hasta de 150 a 200 en *Agave Rhodacantha*. Los márgenes exhiben una gran diversidad morfológica, los dientes córneos (en la mayoría de las especies) sobresalen como proyecciones de tejido, o bien se ubican sobre una banda córnea continua, mientras que en otras es filífero y se desprende en delgadas fibras o bien muestra dientecillos microscópicos, semejantes a filosas sierras. La hoja casi siempre tiene una espina al final del ápice que puede medir desde algunos centímetros. El envés muestra la huella de los dientes de la hoja que le antecedió, lo que es muy notorio en las especies con hojas suculentas. El color de las mismas se presenta en tonos de verde y glauco o amarillos rojizos o violetas.

La edad de los agaves se puede llegar a ser una razón de estudio ya que muy pocos trabajos abordan el tema, las especies grandes alcanzan su madurez entre los 7 a 10 años, mientras que las pequeñas especies lo hacen después de crecer entre cuatro a cinco años. La inflorescencia que surge del meristemo apical del maguey suele ser desproporcionada en relación con el tamaño de la planta; es de apariencia espigada en el subgénero *Littaea* y racemosa o paniculada con racimos laterales compuestos en el subgénero *Agave*. El pedúnculo floral tiene brácteas que se reducen en tamaño desde la base hasta el ápice. Las flores tienen diferentes grados de succulencia, son bisexuales, tubulares con ovario ínfero, poseen seis tépalos de coloración verdoso-amarillenta en muchas especies, aunque las hay de color amarillo intenso y rara vez tiene tonos rojizos o violetas; los estambres son seis, muy largos, ya que sobrepasan a los tépalos, al igual que el estilo. En base del tubo se disponen tres nectarios que producen abundante néctar y fragancia que se perciben a cierta distancia. Las flores son protándricas, es decir, los estambres se desarrollan y maduran antes que los capelos. El fruto es una capsula seca, trilocular, con semillas dispuestas en dos hileras por lóculo, que son negras aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal redondeada.

Son varias las características de los agaves que les permiten evitar una excesiva transpiración; una reducción en la superficie que transpira en relación con el

volumen total del órgano, la presencia de una cutícula gruesa en la epidermis de la hoja, la cual acumula una cera en la superficie y la presencia de estomas de naturaleza compleja que aseguran una protección adicional contra la evaporación durante los periodos de sequía. El excesivo calentamiento de la lámina foliar disminuye con el arreglo de las hojas en el espacio (filotaxia) y la orientación favorece la sombra de unas sobre las otras. El bandeo de las hojas con segmentos alternantes claros y oscuros se debe a las variaciones en el grosor de la cutícula y aparentemente, se origina por condiciones irregulares de crecimiento, que dependen de las condiciones climáticas.

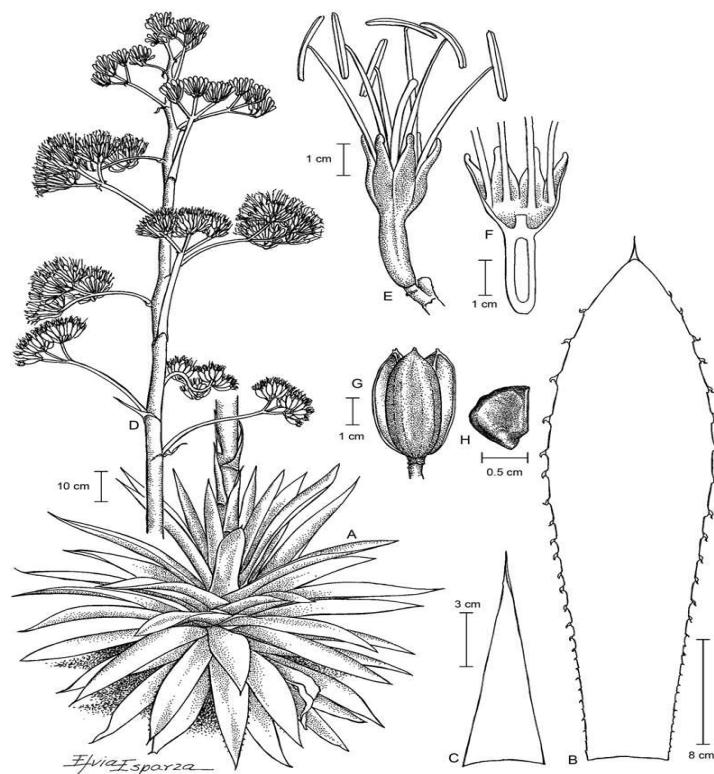


FIGURA 1: AGAVE LYOBAA GARCÍA-MEND. & S.

1.1.3 CLASIFICACIÓN

El sistema de clasificación más reciente, a un nivel infragenérico, fue elaborado por Gentry en 1982; sin embargo, su obra sólo incluye los agaves de Norteamérica continental, dejando fuera las especies del Caribe y Sudamérica. Gentry presenta los

resultados de un intenso trabajo de campo en el que observó, analizó, colectó y preparó ejemplares de herbario. En la delimitación de las especies emplea caracteres morfológicos, proporcionando descripciones detalladas de las plantas, discute la variación en las poblaciones y menciona los complejos taxonómicos, tipificando, además, cada taxón, con lo cual resuelve numerosos problemas de nomenclatura. Señala asimismo áreas de distribución, características del hábitat, aspectos fenológicos, usos de las especies y presencia de compuestos secundarios. Muchos taxones se ilustran o se observan mediante fotografías en la naturaleza. Colectó más de 900 especímenes de herbario para sustentar sus conclusiones. Con base en este importante trabajo, se han descrito posteriormente quince nuevas especies de varias partes de la república. Gentry organizó el género por sus características florales y vegetativas, dividiéndolo en dos subgéneros, con base en el tipo de inflorescencia y la disposición de las flores. El subgénero *Agave* está dividido en doce grupos con 83 especies, y el subgénero *Littaea* en ocho grupos con 53 especies. El grupo no es una categoría taxonómica de acuerdo con el Código de Nomenclatura Botánica, sin embargo, su uso le permitió agrupar especies de una manera práctica. (García-Mendoza, 2002)

Actualmente, la taxonomía de *Agave* dista de estar completa. Ha habido propuestas de cambios en la nomenclatura y en la estructura de varios taxones, se siguen describiendo nuevas, se siguen describiendo nuevas especies que han hecho crecer los grupos, pero no se ha avanzado en la delimitación de los mismos. Las nuevas propuestas de subdivisión tendrán que considerar todas las especies del género para formarse una idea adecuada de sus límites. A esto contribuye favorablemente una mejor exploración del territorio nacional, lo cual ha redundado en un conocimiento biológico más detallado, mejores colecciones de plantas vivas y herbario, que es la base de estudios taxonómicos, biogeográficos, etnobotánicos, bioquímicos y moleculares. A este respecto, el Instituto de Biología de la UNAM posee las mejores colecciones a nivel nacional: la de plantas vivas en el Jardín Botánico y la de ejemplares herborizados, depositados en el herbario Nacional MEXU. Ambas colecciones fueron enriquecidas durante las décadas de 1980 y 1990, y lo siguen

siendo en lo que va del presente siglo. El jardín Botánico tiene más de 60% de las especies de México, mientras que en MEXU está el 100% de los taxones, hay duplicados de más de 90% de los ejemplares herborizados por Gentry, así como nuevos ingresos realizados por otros colectores; todo esto ha aumentado las colecciones, llegando a más de cinco mil especímenes, lo cual significa que la institución tiene la mejor colección de agaváceas de México a nivel mundial.

La biología molecular es una herramienta que permite visualizar de otra manera la clasificación de los organismos y, en el caso de *Agave*, se han iniciado estudios que permitirán iniciar estudios que permitirán tener una mejor comprensión, no sólo a nivel subgenérico, sino también intergenérico, ya que su delimitación con respecto a los géneros herbáceos cercanos, como *Manfreda* y *Polianthes* aún no ha sido resuelta. Todo esto nos permite seguir adentrándonos en el conocimiento de estas plantas emblemáticas de nuestro país. (Gentry, 1982)

1.1.4 ORIGEN

En los agaves, al igual que en la familia *agavaceae*, el número cromosómico básico (x) y el haploide (n) suman 30 ($2n = 60$), por lo que se consideran organismos paleopoliploides, esto es, que a partir de estos números cromosómicos se pueden desarrollar poliploides secundarios o neopoliploides, es decir, especies con números gaméticos que son múltiplos de número básico actual ($x = 30$). Los agaves tienen cariotipos bimodales altamente asimétricos (cinco cromosomas largos y veinticinco cortos), característica que podría estar asociada con una gran especialización morfológica y ecológica. Existen poca información sobre especiación en el género. Los más importantes son de tipo genético y presuponen que la especiación se puede llevar a cabo mediante neopoliploidia, hibridación por anfiploidia, rearrreglos cromosómicos y mutaciones puntuales y reproducción vegetativa.

La neopoliploidia es un fenómeno muy extendido en las plantas; se puede originar por autoploidización (interespecífica). En *Agave* los múltiplos del número cromosómico (x), son $3x$, $4x$, $5x$, $6x$, y $8x$, por lo que entre las especies poliploides se encuentran *Agave ornithobroma*, que es triploide y tiene un número cromosómico de $2n = 3x$

=60; Los poliploides en *Agave* pueden formarse por medio de gametos no reducidos y tienen ventajas sobre sus parientes diploides, ya que originan nuevos fenotipos con una mayor capacidad de adaptación y respuesta a ambientes extremos, lo que puede contribuir al éxito de los poliploides en la naturaleza o en su selección y uso en la agricultura, como es el caso de los clones triploides de *Agave angustifolia*, seleccionados por los productores de mezcal en el estado de Oaxaca. (Nobel, 1988)

La hibridación por anfiploidia se origina entre dos especies que viven en las mismas áreas, esto es, por simpatría; tenemos así que *agave x arizonica* es un híbrido de *Agave chrysantha* y *A. toumeyana* ssp. *bella*. Este fenómeno se ha documentado en la naturaleza, en donde se ha encontrado individuos con características morfológicas intermedias de sus parentales, crecen donde las áreas de distribución se sobreponen, los periodos de floración son simultáneos y por lo general presentan bajos porcentajes de polen y de semillas fértiles.

En las especies que se reproducen vegetativamente no se da la recombinación genética y se creía que los descendientes eran genéticamente homogéneos, pero se ha demostrado cierta variabilidad genética transmitida vía la reproducción asexual. Se considera que en los agaves los procesos de hibridación, poliploidía y reproducción vegetativa son una estrategia evolutiva importante. Los procesos de especiación implican cambios rápidos en el genoma debido a la hibridación y a la neopoloploidia, por lo que es posible considerar que el género se encuentra en una etapa de evolución activa, con un alto grado de afinidad genética entre las especies. La alopoliploidía ocurre muy fácilmente entre taxa, ya que las barreras al entrecruzamiento no existen o son muy débiles, lo que hace que en la naturaleza se observen poblaciones polimórficas con una serie de híbridos interespecíficos o intersubgenéricos. Las barreras al entrecruzamiento se dan por aislamiento espacial o temporal en la floración, sin embargo, es necesario aclarar que el conocimiento sobre los procesos de especificación en *Agave* es limitado.

1.2 CULTIVO Y USOS

Los agaves se reproducen de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se logra mediante la polinización que efectúan algunos animales, principalmente murciélagos nectarívoros y, en menor grado, insectos diurnos y nocturnos (palomillas, abejas, abejorros) y aves (colibríes, aves percheras). Los agaves con inflorescencias paniculadas (subgéneros *agave*) son polinizadas por los murciélagos *Leptonycteris curasoae*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga sp.*, mientras que los agaves son inflorescencias espigadas (subgénero *Littaea*). Son polinizadas principalmente por insectos, lo que hace que la transferencia de polen de una flor a otra sea nocturna en los magueyes polinizados por murciélagos y diurna en los magueyes polinizados por insectos o aves.

En el maguey pulquero (*Agave salmiana*), el espadín (*A. angustifolia*), el blanco (*A. americana*), el papalometl (*A. Potatorum*) y el de cerro (*A. aspérrima*), el sistema de reproducción es de tipo semélparo o monocárpico, es decir, las plantas mueren después de reproducirse; la semelparidad es una forma de reproducción poco común en las plantas con flores y pudo haber evolucionado debido a la altura de la inflorescencia, ya que las flores a mayor altura son más atractivas para los polinizadores; subsecuentemente, al incrementar las plantas progresivamente su esfuerzo reproductivo, los recursos asignados al despliegue floral alcanzaron un máximo, causando la muerte de la planta. Otras especies pueden ser consideradas iteróparas o policárpicas, pues sólo muere la roseta que tiene la inflorescencia, pero no el individuo; es el caso del cacalotentli (*Agave Angustiarum*), las gallinitas (*A. stricta*) y el maguey chamula (*A. chiapensis*). Hay también plantas que son solitarias, cuya roseta muere varios meses después de haber fructificado, por lo que durante largo tiempo las hojas se conservan turgentes, como en el socolume (*Agave Applanata*) y el maguey escobeta (*A. Convallis*).

La producción de frutos y semillas es grande en los agaves; algunas inflorescencias, como las de *Agave Deserti*, producen hasta 65 000 semillas, y una vez maduras son dispersadas por el viento. Son también el alimento de numerosas lavas de insecto,

que las horadan a la altura donde se encuentra el embrión y las sustancias de reserva, por lo que es común observar grupos de semillas huecas y adheridas entre sí; y una vez en el suelo son también el alimento favorito de una gran cantidad de insectos, como las hormigas.

La mayoría de los agaves se propagan de manera asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia. Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta, o mediante estolones emergen a alguna distancia de la madre, producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente. Los hijuelos intrafoliares se originan entre las hojas de la roseta y se desarrollan cuando se desprenden de la planta madre o ésta muere. Los bulbillos, en cambio, se originan en la inflorescencia junto a las flores.

La producción de clones es un mecanismo que permite a las plantas una mayor capacidad de ampliar su área de distribución; es el caso de *Agave lechuguilla*, cuyas poblaciones en el altiplano mexicano cubren vastas extensiones de terreno. *Agave deserti* y *Agave cerulata* dependen casi por completo de la reproducción vegetativa y, aunque producen abundantes flores y semillas, el establecimiento de las plántulas es un fenómeno raro debido a que ésta es la fase más vulnerable en el ciclo de la vida de los agaves, pues tienen una cantidad para absorber agua y están expuestos a grandes variaciones de temperatura en la superficie del suelo, por lo que dependen de manera crítica de plantas nodrizas; además, constituyen un alimento succulento y nutritivo para los insectos. En 1992, Nobel documentó que tras 29 años de observar plantas de *Agave deserti*, únicamente se establecieron diecisiete plántulas en un área en donde había 2900 recetas.

Entre las plantas más conspicuas del paisaje mexicano, en especial de las zonas áridas y semiáridas de México están los Agaves o Magueyes los cuales son plantas tropicales de usos múltiples entre los cuales destaca su utilización para obtención de licores, el empleo artesanal de la fibra de sus hojas y la aplicación tradicional en la medicina, siendo considerados especies clave en esas regiones, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos.

En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica, cultural y religioso para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebidas, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos.

1.2.5.1 ESPECIES DE AGAVE PARA ELABORACIÓN DEL MEZCAL.

La calidad e identidad de cada mezcal la definen las materias primas, procesos de transformación y contextos culturales de consumo. Cada tipo de maguey sea dulce, aromático o ácido lo vuelve un abanico de posibilidades de diversas condiciones de altitud, clima y suelo, gracias a la compleja topografía de nuestro país. La cuidadosa selección y cosecha de plantas, junto al conocimiento y técnicas de elaboración de la bebida, integran la experiencia, saber hacer de cada región que hace del mezcal una bebida espiritual.

TABLA 1 VARIEDAD DE AGAVES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL MEZCAL

IMAGEN	DESCRIPCIÓN SEGÚN LA ESPECIE
--------	------------------------------

 FIGURA 2: AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW	<i>Agave Angustifolia Haw</i> También conocido como el maguey espadín. Es el maguey de más amplia distribución, ancestro del maguey azul tequilero y del henequén. chelem (maya), doba-yej (zapoteco: maguey de flor), hamoc(seri), juya cuu (mayo: mezcal del monte), yavi incoyo (mixteco), amole, bacanora, maguey de campo, espadilla, espedín, mezcal, zapupe.
 FIGURA 3: AGAVE POTATORUM	Papalometl (<i>Agave Potatorum</i>). Conocido también como tóbala, es uno los magueyes silvestres más apreciados para mezcal en Oaxaca, biliá, dob-bé, dob-la, tóbala (zapoteco),papalometl (náhuatl: maguey mariposa), yauiticushi (mixteco), maguey de monte.
 FIGURA 4: AGAVE RHODACANTHA	<i>Agave Rhodacantha</i> También conocido como el maguey mexicano. Su belleza y solitaria presencia en las tierras altas le valieron el nombre de “mexicano”. Quixe, mexicano, mezcal, maguey de monte.
 FIGURA 5: AGAVE MARMORATA	(<i>Agave Marmorata</i>) también llamado tepextate. Su hermosa inflorescencia tiene importantes usos ornamentales y ceremoniales. Tdu-cual (zapoteco), pitzometl (náhuatl), maguey de caballo, curandero, tepeztate.
 FIGURA 6: AGAVE KARWINSKII	(<i>Agave Karwinskii</i>) conocido como madre cuixe. Propio de zonas áridas del sur y con numerosas variantes. Al-mal-bi cuiish (chontal), bicuexe

FUENTE: Propia

1.2.1 ZONA GEOGRÁFICA

El género *Agave* (sensu stricto) es endémico de América. De sus aproximadamente 200 especies, 150 se encuentran en México, más 36 que pertenecen a categorías infraespecíficas, lo cual constituye un total de 186 taxones. La distribución del género abarca del sur de los Estados Unidos (con dos especies disyuntas en

Florida) hasta Colombia y Venezuela. Esta área incluye todas las islas del Caribe, desde las Bahamas de Aruba, Curacao y Trinidad y Tobago. Los países con el mayor número de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala; los demás tienen menos de ocho especies, cifra que representa menos del 3% del total.

En México, el género *Agave* tiene una amplia distribución, se encuentra en más de 75% del territorio; sin embargo, su distribución es altamente asimétrica, hay regiones que poseen más especies que otras. Son muy diversos del centro y norte, pero su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Oaxaca y Jalisco. Son abundantes en las provincias florísticas de las Serranías Meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano Mexicano, Península de Baja California y Sierra Madre Oriental. Pero al subdividir México en cuadrantes de un grado de longitud, el área de mayor riqueza corresponde a un cuadrante ubicado en la provincia del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, con quince especies. Es el área de mayor diversidad en México, pues no sólo conserva una gran riqueza de grupos taxonómicos, sino también filogenéticos.

El subgénero *Agave* está conformado por más de 103 especies, ocupa un área mayor en la república mexicana, y sus taxones tienen áreas de distribución más amplias, pero también la zona con mayor riqueza se ubica en el valle de Tehuacán.

El subgénero *Littaea*, constituido por 47 especies, cubre una menor superficie de México y está ausente en las penínsulas de Baja California y Yucatán. El área con mayor diversidad corresponde a la barranca de Metztitlán, en el estado de Hidalgo. A nivel estatal, los estados más diversos son Oaxaca, con 37 especies, Puebla con 31, Sonora con 30, Querétaro con 26 y Durango con 24.

Hay un importante componente endémico en la diversidad de agaves en México. De los 186, 129 son exclusivos del territorio mexicano correspondiente al 69%. El nivel de endemismo puede ir desde aquellas especies restringidas al territorio, pero amplia distribución, como *Agave Rhodacantha*. Que se encuentra en más de tres

estados, hasta las microendémicas cuya distribución se restringe de uno a tres cuadros de un grado de latitud y longitud por lado. En esta categoría se hallan 88 taxones, 68% de las 129 endémicas de México.

Así pueden ser especies localmente abundantes, pero en ocasiones se restringen a algunas montañas o cañones de algún río. La provincia del Valle de Teotihuacán, en los límites de Oaxaca y Puebla, con ocho especies microendémicas, es el área con mayor riqueza en el país, seguida de las montañas del este de Chiapas, en los límites con Oaxaca. El alto grado de endemismo de especies que existe en México se debe a la heterogeneidad del territorio y a las propiedades intrínsecas de cada taxón, tales como su plasticidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión, germinación de sus semillas, así como a sus interacciones bióticas como otros organismos, como los polinizadores, y a factores como los eventos históricos que han tenido lugar en Norteamérica, los cuales han influenciado la distribución actual de las especies.

Los tipos de suelos que favorecen el crecimiento de los agaves son diversos y pueden ser tanto de origen ígneo como sedimentario siendo principalmente calizas. Esta diversidad de ambientes es uno de los factores que ha favorecido el gran número de taxones en México.

1.2.2 ANTECEDENTES

Los magueyes fueron una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica para alimentarse, de lo cual se hallan restos en cuevas en el Valle de Oaxaca, el de Tehuacán y en Coahuila

El empleo como alimento y fibras pervive en México desde hace por lo menos siete mil años.

Los grupos humanos que se establecieron en estas regiones desarrollaron uno de los principales centros agrícolas de América. Al aprovechar los magueyes, estos pueblos hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana, pues los escogían por sus fibras, el aguamiel o las altas

cantidades de azúcares que les proporcionaba lo que posteriormente se denominaría en náhuatl como *mexcalli*, es decir el tallo y bases de las hojas (cabezas) cocidas. Es por esto que los agaves no solo tienen su máxima expresión de diversidad morfológica, filogenética y evolutiva de México, sino también cultural, ya que los seres humanos que lo han poblado han sabido aprovechar al máximo los beneficios que producen.

Antes de la llegada de los españoles los Agaves eran utilizados para la producción de azúcares y fibras, los indígenas lo utilizaban como alimento en tiempos de falta de maíz y otros insumos. Su uso decayó cuando el cultivo de la caña de azúcar llegó a América con los conquistadores y se empezó a hacer más relevante en la obtención de licores. Históricamente ha sido utilizada desde épocas prehispánicas para la producción de licor, y éste se ha comercializado desde principios del siglo XX tanto en México como en el mundo (Bautista, 2000).

Uno de los constituyentes principales de los Agaves son los polisacáridos, razón por la cual el pasado y presente de estas plantas están acompañados por la obtención de alcoholes para la fabricación de licores; sin embargo, el futuro pudiera estar acompañado por la obtención de alcoholes para fabricar combustibles (Hernández, 2012).

Las *agaváceas*, comúnmente llamadas “magueyes”, forman parte de la familia de las *monocotiledóneas*, cuenta con nueve géneros y aproximadamente 330 especies y encontrando nuevas especies que aún no son clasificadas o estudiadas, siendo endémica del continente americano, las cuales se encuentran desde los límites de Canadá con los Estados Unidos de Norteamérica, hasta Bolivia, en Sudamérica, incluyendo las islas del Caribe, siendo particularmente abundante en zonas semiáridas, templadas y extremas, y por ende menos abundantes en aquellas tropicales, de ahí el que la mayoría de las especies estén adaptadas a ambientes secos con fuertes fluctuaciones de temperatura y altos niveles de radiación solar; las otras, están adaptadas a climas cálidos y fríos, así como donde hay la alternancia de ciclos lluviosos con secos (Berumen, 2009).

1.3 BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Las bebidas alcohólicas son aquellas bebidas que contienen alcohol etílico, también llamado etanol. Podemos distinguir diversos tipos de bebidas alcohólicas por su modo de producción, bien sea por fermentación alcohólica o destilación/maceración de sustancias generalmente fermentadas.

1.3.1 TIPOS DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Bebidas alcohólicas fermentadas:

Las bebidas alcohólicas fermentadas son aquellas bebidas que se obtienen tras transformar en alcohol etílico los azúcares que contienen determinadas frutas, raíces o granos de plantas. Mediante este proceso la concentración de alcohol nunca es superior a 17 g por cada 100 g de fermento de alcohol y habitualmente las bebidas elaboradas mediante este proceso tienen un grado alcohólico que oscila entre los 5 y 15 grados. Las bebidas alcohólicas fermentadas más conocidas (y más antiguas) son por ejemplo el vino, la cerveza o la sidra.

Bebidas alcohólicas destiladas:

Las bebidas alcohólicas son aquellas que se obtienen a través de un proceso artificial llamado destilación, por el cual se le aumenta a una bebida fermentada la concentración de alcohol etílico. Estas bebidas suelen tener un grado alcohólico de entre 17 y 45 grados y las más conocidas son por ejemplo la ginebra o el vodka.

Bebidas alcohólicas fermentadas mezcladas con destilados:

Las bebidas alcohólicas fermentadas mezcladas con destilados son aquellas bebidas, dentro de la estandarización se utilizan, destilados con mayor y menor grado alcohólico para estandarizar el producto, para que estas mezclas puedan llamarse vinos su grado alcohólico no debe ser mayor de 20 grados. Si, por el contrario, es un destilado alcohólico (un aguardiente) el que es mezclado con una pequeña cantidad de vino, el resultado es llamado aguardiente.

1.3.2 MEZCAL

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, que se elabora de una manera muy similar al tequila. El proceso comienza con la cosecha del agave después de 7 años de cultivo aproximadamente, en esta etapa las plantas son cortadas de su base y la mayor parte de sus hojas son retiradas, obteniéndose las piñas de agave, las cuales son cocidas en hornos o autoclaves. En esta etapa, los polisacáridos, principalmente los de reserva (*fructanos*), son hidrolizados térmicamente para obtener un jarabe rico en fructosa que, posteriormente se somete a fermentación alcohólica con levaduras nativas o cepas seleccionadas, finalmente el mosto con un contenido de etanol de 3- 6 % v/v aproximadamente se destila para obtener el mezcal blanco o joven (Diario Oficial de la Federación,, 2017).

Mientras que, en el caso del mezcal, la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2017 indica que se puede emplear en su elaboración una amplia variedad de agaves, siendo los más utilizados: *Agave angustifolia*, *Agave esperima*, *Agave weberi*, *Agave potatorum* y *Agave salmiana*. Otra diferencia importante entre el mezcal y el tequila es su procesamiento, en el primero, generalmente es un proceso artesanal, en cambio en el tequila se tiene un proceso tecnificado. También es importante aclarar que las zonas geográficas que cuentan con Denominación de Origen para el mezcal están más dispersas en el territorio mexicano, mientras que en el caso de tequila es una región más reducida, lo que agrega un factor de variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región.

El término mezcal (del náhuatl *mexcalli*, 'maguey cocido', de *metl* 'maguey' e *ixcalli* 'cocido' y juntos quieren decir maguey cocido), la palabra agave proviene del griego *agavos* que significa noble, admirable, término utilizado por Linneo en 1953 en el documento *Species Plantarum* como consecuencia de las características de la planta de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 070-SCFI-2016 Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones, se denomina mezcal a la bebida alcohólica que se obtiene por la destilación y rectificación de los mostos de jugo de agave preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras (piñas) de los

agaves de las especies *Angustifolia haw* (Espadín), *Potatorum zucc* (Tóbala), es apto considerar otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominación de origen dentro del mismo estado del cual son provenientes y por ende cocidas y sometidas a fermentación para preparar una bebida alcohólica. El mezcal es un líquido de olor y sabor sui géneris (único) de acuerdo a su tipo; es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble o encino. (Diario Oficial de la Federal de México, 2016)

El mezcal tiene tres acepciones, en la actualidad:

- En su sentido primigenio, se refiere al alimento obtenido de la cocción del tallo y de la base de las hojas de esta planta.
- Es el nombre común de algunas especies de maguey o agave, en México.
- Es el nombre de una bebida alcohólica tradicional mexicana, que puede producirse en nueve diferentes estados del país, elaborada a partir de la destilación del corazón del maguey.

Existen diferentes tipos de maguey, y cada uno produce una versión diferente de mezcal; una de las más conocidas, aunque no responde exactamente a la definición tradicional del mezcal, es el tequila. En pocas palabras, el tequila es, en realidad, un tipo de mezcal. La producción del mezcal está regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016.

La producción del mezcal en su forma tradicional se lleva a cabo en las siguientes etapas; recepción de las piñas, cocción en horno de piedra y tierra, molienda, extracción del jugo, fermentado, destilación, envasado y madurado en caso de ser reposado o añejado, este proceso es realizado en pequeñas fabricas denominados palenques. Siendo el mezcal obtenido de un proceso fermentado un líquido de olor y sabor original, incoloro o ligeramente amarillento cuando este es reposado o añejado, o cuando es sometido a aboque (adición de uno o más productos naturales,

saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes para suavizar su sabor) sin reposarlo o añejarlo.

El mezcal se obtiene a partir de plantas de agaves pertenecientes a la familia *agavaceae*. En México este género es muy diverso y está representado por 136 especies de agave, sin embargo, es obtenida únicamente a partir de unas cuantas especies. La bebida es producida en diferentes estados de la República Mexicana, estos cuentan con la denominación de origen, tal es el caso de Michoacán, Durango, Guanajuato, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. La mayor producción se da en el estado de Oaxaca a partir de mostos destilados de las especies de agaves espadín (*Angustifolia Haw*) y del agave silvestre (*A. Potatorum Zucc.*) (Colunga et al, 2006). En el estado de Oaxaca esta bebida es obtenida de diferentes regiones, siendo los municipios de Yautepec, Santiago Matatlán Tlacolula, Miahuatlán, Ejutla, Ocotlán, Solá de Vega y Zimatlán los mayores productores.

1.3.3 REGIÓN DEL MEZCAL EN EL ESTADO DE OAXACA.

Los distintivos políticos que integran la Región del Mezcal son: Tlacolula, Yautepec, Miahuatlán, Sola de Vega, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán., en razón de que en esta región del estado de Oaxaca se concentran la mayor parte del inventario magueyero, entre los cuales están los productores de maguey, productores de mezcal, envasadoras de mezcal.

1.3.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL EN EL DISTRITO DE VALLES CENTRALES DE OAXACA

1.3.4.1 Descripción del proceso de producción del mezcal artesanal.

Para el proceso de producción del mezcal es necesario tomar en cuenta las etapas principales del proceso de producción, así como los factores fisicoquímicos que influyen dentro del proceso, es de gran importancia tener en cuenta que para un mezcal adquiera las características organolépticas deseadas estos parámetros deben estar correctamente controlados.

1.3.4.1.1 COSECHA O CORTE DEL AGAVE.

El cultivo de agave es realizada en determinadas condiciones donde se aprovecha los nutrientes que le proporciona el suelo para su desarrollo, y el corte es necesario realizarlo cuidadosamente tomando en cuenta que en la piel de la piña se encuentran unos compuestos llamados pectinas los cuales son carbohidratos estructurales de las plantas, existen dos tipos: metoxiladas y las no metoxiladas, las primeros son las que dan origen al metanol por la hidrólisis ácida, por esta razón es recomendable que el corte de las pencas se realice cuidadosamente, las características que los productores toman en cuenta cuando realizan la jima es la edad de maguey que va de 7 a 10 años, como indicador de madurez, es una coloración pálida, amarillenta y tendiente a rojiza, sus pencas tienden a ser menos rígidas y a doblarse, dando un aspecto de planta marchita.

1.3.4.1.2 COCCIÓN

El cocimiento tiene por objeto hidrolizar la inulina y transformar los azúcares como la fructosa y glucosa (monosacáridos fermentables). Sin embargo, el uso de altas temperaturas puede degradar los azúcares y formar compuestos no fermentables, lo cual puede reducir el rendimiento del proceso, provocando una variación en los compuestos obtenidos, teniendo en cuenta que cada etapa del proceso debe ser controlado para la obtención de un mezcal que cumpla con las especificaciones de la norma.

En temporadas de lluvia el tiempo de cocción se incrementa, aumentando los problemas en el cocimiento de las piñas de agave, donde la falta de calor y la transformación de los azúcares puede mermar la producción del mezcal a los productores.

1.3.4.1.3 MOLIENDA

Después de la cocción el agave procede a su disminución de tamaño, por medio del corte para la molienda, utilizando algún utensilio que ayude al productor. En el estado podemos encontrar dos métodos de molienda: manual o por medio de un molino

chileno (también conocido como molino egipcio). Con la molienda se consigue una mejor utilización de los azúcares durante la fermentación, esto dependerá también de la calidad del triturado. Los azúcares disponibles son mejor utilizados por las levaduras para la transformación de etanol, al tener menor área de contacto se facilita el uso de estos azúcares y al tener mayor área de contacto tardara un poco más para transformar estos azúcares a etanol.

La fuente de azúcar característica de los mostos de agave es la fructosa. Esta se obtiene de un tipo especial de polisacáridos (la inulina), durante el proceso de cocción (duran, *et al*, 2007).

La calidad de una bebida alcohólica no solamente se basa en el cumplimiento de las especificaciones de las normas oficiales vigentes, debido a que también se deben considerar algunos factores subjetivos, entre ellos, el más importante es la aceptación del consumidor en función de las características sensoriales que percibe, las cuales están asociadas a la composición de los productos, ya que la interacción de los componentes volátiles entre sí y con los receptores sensoriales del consumidor, producen las sensaciones *sui generis* de aroma y sabor (Tešević, 2005).

El análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas es un problema analítico complejo, desde su aislamiento, caracterización e interpretación de su efecto sobre las características sensoriales finales reportan que se han identificado aproximadamente 800 componentes en vinos mediante técnicas de detección olfatométrica y cromatografía de gases, de los cuales, se han identificado de 40 a 50 compuestos como los principales agentes responsables de la producción de aromas. Aun así, la reconstitución de bebidas alcohólicas solamente se ha logrado en tres clases de este tipo de bebidas (Ferreira, 2002). Sin embargo, la caracterización de la composición de bebidas alcohólicas ofrece ventajas en su procesamiento y en sus propiedades sensoriales finales, en la selección de cepas de levaduras por la producción de terpenos en la selección de barricas para los procesos de reposo y añejamiento y en el efecto de la región de cultivo de la materia prima sobre el contenido de odorantes importantes (Carrau, 2005).

El análisis de componentes volátiles en bebidas alcohólicas por cromatografía de gases es complicado debido a que el agua y el etanol representan casi el 98-99% del área de los picos cromatográficos, mientras que en el porcentaje restante se encuentra distribuido en más de un centenar de componentes (Sanchez-Arreguin, 2005).

1.3.4.1.4 GRADO ALCOHÓLICO.

Es el volumen de alcohol etílico expresado en centímetros cúbicos contenidos en 100cm³ de bebida alcohólica, a una temperatura determinada. (Diario Oficial de la Federación, 2017)

1.3.4.1.5 GRADO ABSOLUTO.

Es el producto de multiplicar el grado alcohólico, en Gay Lussac, por el volumen medido en litros. Debe expresarse en litros. [(Diario Oficial de la Federación, 2017)]

1.3.4.1.6 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. (Diario Oficial de la Federación, 2017)

1.3.5 NORMATIVIDAD PARA EL MEZCAL

De acuerdo con la NOM-070-SCFI-2017, el mezcal es una bebida alcohólica obtenida por destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, mismas que son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica.

El mezcal es una bebida que cuenta con la denominación de origen, el cual comprende territorios protegidos en los estados de Durango, Guanajuato, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

1.3.6 TIPOS Y CATEGORÍAS DE MEZCAL DEFINIDAS EN LA NOM-070-SCFI-2016

La norma antes mencionada, considera dos tipos de mezcal, de acuerdo al porcentaje de carbohidratos provenientes del agave utilizado en su elaboración.

Ya que para sustituir a los carbohidratos que se necesita para llevar a cabo la fermentación, es posible utilizar cualquier otra fuente que nos proporcione estos carbohidratos, de esta manera podremos tener como clasificación lo siguiente:

Tipo I. Mezcal 100% Agave. Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves; previamente hidrolizadas o cocidas a fermentación alcohólica con levaduras (cultivadas o no). Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.

Tipo II. Mezcal. Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han adicionado hasta 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes.

De acuerdo con las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el mezcal se clasifica en 3 categorías:

Mezcal añejo o añejado. Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año, en recipientes de madera de roble blanco o encino.

Mezcal joven. Producto obtenido por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas de agaves previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras (cultivadas o no).

Mezcal reposado. Producto susceptible de ser abocado que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino para su estabilización.

1.3.6.1 TOXICOLOGÍA DEL METANOL

El metanol (CH_3OH) se denomina alcohol metílico o alcohol "de madera" por qué originalmente se obtenía de la destilación de esta materia prima en ausencia de aire. Actualmente puede producirse a partir de gas natural, carbón, madera, e incluso de residuos orgánicos (biomasa celulósica). Es el más simple de los alcoholes y se caracteriza por ser incoloro. Fue descubierto por Boyleen 1661 en el alquitrán de madera (Enciclopedia Larouse Tomo I, 1999)

1.3.6.1.1 METANOL COMO CONTAMINANTE EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS

El contenido de alcohol etílico en una bebida que no se haya sometido a controles de calidad y sanidad, puede estar diluido o rebajado con metanol, un alcohol derivado de la madera que al metabolizarse ocasiona ceguera permanente. Su ingestión causa ceguera porque destruye irreversiblemente el nervio óptico y una dosis mayor a 30 mL puede causar la muerte.

1.3.6.1.2 INTOXICACIÓN POR METANOL

La contaminación con metanol, se produce en el momento de la fermentación de jugos azucarados para la obtención de bebidas alcohólicas, en la cual, además de etanol, se producen también cantidades variables de metanol y otros compuestos volátiles (Katzung, 2000).

El metanol no es un producto de la fermentación alcohólica, ya que su presencia en este tipo de bebidas se debe a la desesterificación de las pectinas estearasas presentes en las frutas.

El límite permisible de este alcohol según las normas oficiales mexicanas NOM-142-SSA1-1995 y NOM-053-SSA1-1193, es de 30.00 mg/100 mL de bebida cuando éstas son destiladas y 30.00 mg/100 mL de alcohol cuando se trata de bebidas fermentadas (Gilman, 2000).

La intoxicación por metanol ocurre frecuentemente por vía digestiva en el caso de bebidas alcohólicas adulteradas con alcohol desnaturalizado o por vía respiratoria,

digestiva o a través de la piel intacta en el caso de exposición en ambientes laborales, desde donde se pueden originar intoxicaciones graves y aún mortales.

El metanol se absorbe con rapidez en el cuerpo por inhalación, por vía oral y tópica, el metabolismo hacia ácido fórmico es rápido, y se oxida a dióxido de carbono por una enzima dependiente de la presencia de ácido fólico.

La mayor parte de los métodos usados en la determinación de metanol se basan en su oxidación a formaldehído y la posterior determinación de este último, aunque actualmente por medio de la cromatografía de gases, es posible la determinación del metanol como tal (Enciclopedia Encarta Microsoft, 2000).

El alcohol metílico se absorbe por todas las vías (oral, dérmica y respiratoria), aunque la absorción por piel difícilmente pueda dar lugar a intoxicaciones agudas. Con frecuencia se plantea el problema bajo la forma de intoxicación crónica.

Su carácter irritante genera frecuentes lesiones de entrada, muy típicas en la contaminación crónica por vía respiratoria, como bronquitis crónicas, frecuentemente con componentes asmátiformes, y alteraciones en la mucosa de las vías respiratorias altas.

Puede provocar neumonía por aspiración pulmonar. El metanol se distribuye rápidamente en los tejidos de acuerdo al contenido acuoso de los mismos, ya que su volumen de distribución es de 0.6 L/Kg de peso. La mayor parte del metanol circula en el agua plasmática. Una vez absorbido se dirige al hígado donde sufre procesos de oxidación a una velocidad 7 veces menor comparada con las del alcohol (Raymond, 1998).

1.3.6.2 ALCOHOLES SUPERIORES

Los alcoholes superiores son los que tienen más de dos átomos de carbono. Tienen sobre el organismo un efecto narcótico muy superior al del alcohol etílico. En los destilados se encuentran en proporciones muy bajas, por lo que fisiológicamente su efecto es modesto.

Se forman algunos durante la fermentación alcohólica y otros como el 2-butanol se forman durante la conservación o ensilado, por lo que es un elemento que distingue los aguardientes de orujo de los de vinos.

1.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES.

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 en la cual, los componentes de la muestra, se distribuyen entre dos fases de diferente naturaleza, como consecuencia de la variación de velocidad que se establece al ser arrastrados por una fase móvil, líquida o gaseosa, a través de una fase estacionaria, sólida o líquida. (SKOOG & WEST, 2005)

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida.

Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

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. (Valcarcel M, 1988)

La cromatografía consiste en la separación de compuestos para poder identificarlos, cuantificarlos y purificarlos, siendo una de las técnicas analíticas más sensibles, la cromatografía de gases, la misma que está basada en un soluto gaseoso que es transportado por una fase móvil gaseosa, la fase estacionaria suele ser un líquido 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-líquido, 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.

Los métodos para la determinación de la concentración de metanol y alcoholes superiores 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.

1.4.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido dando lugar a la cromatografía de gases y a la cromatografía líquida.

En la cromatografía líquida, cuando la separación involucra predominantemente un reparto simple entre dos fases líquidas inmiscibles, una estacionaria y la otra móvil, el proceso se llama cromatografía líquido-líquido (LLC).

Cuando en la aptitud retentiva de la fase estacionaria intervienen principalmente fuerzas físicas de superficie, el proceso se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC, de liquid-solid chromatography) (o de adsorción). Otros dos métodos de cromatografía líquida difieren un poco en su modo de acción.

En cromatografía de intercambio iónico (IEC, de ionic-exchange chromatography), los componentes iónicos de la muestra se separan por el intercambio selectivo con contra iones de la fase estacionaria.

En cromatografía de exclusión (EC, de exclusión chromatography), la fase estacionaria proporciona una clasificación de moléculas basadas en su mayor parte en la geometría y el tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación en gel, en la química de los polímeros, y de filtración en gel, en la bioquímica.

Cuando la fase móvil es un gas, los métodos se llaman cromatografía gas-líquido (GLC), y cromatografía gas-sólido (GSC). Los métodos que implican fases móviles gaseosas y líquidas, serán tratados en forma individual. Aun cuando hay pocas razones fundamentales para estudios separados, las diferencias en las técnicas de operación y en el equipo justifican su análisis en capítulos individuales.

1.4.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La cromatografía consiste en una técnica de separación, su gran capacidad para resolver muestras complejas ha conducido a utilizarla cada vez más como una técnica analítica. Esta utilización, ha conducido al desarrollo de una instrumentación, que, utilizando siempre la separación por elución, puede operar en continuo, con mayor eficacia para la separación y con un mayor control de las condiciones cromatográficas para incrementar la reproductibilidad de los resultados. de compuestos para poder identificarlos, cuantificarlos y purificarlos, siendo una de las técnicas analíticas más sensibles, la cromatografía de gases, la misma que está basada en un soluto gaseoso que es transportado por una fase móvil gaseosa, la fase estacionaria suele ser un líquido 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-solido.

Entre las técnicas cromatográficas utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases es la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Entre las técnicas cromatográficas utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases es la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles.

Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fase gaseosa, establece los límites de su utilización, que estarán marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar.

La utilización de la cromatografía de gases está delimitada a la separación de compuestos de un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente de 400 °C; dentro de estos límites, como ya se mencionó, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra.

Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de gas inerte a una elevada temperatura; esta corriente de gas, atraviesa la columna cromatográfica que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas - líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o en muchos casos, por medio de una mezcla de ambos.

Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de un sistema.

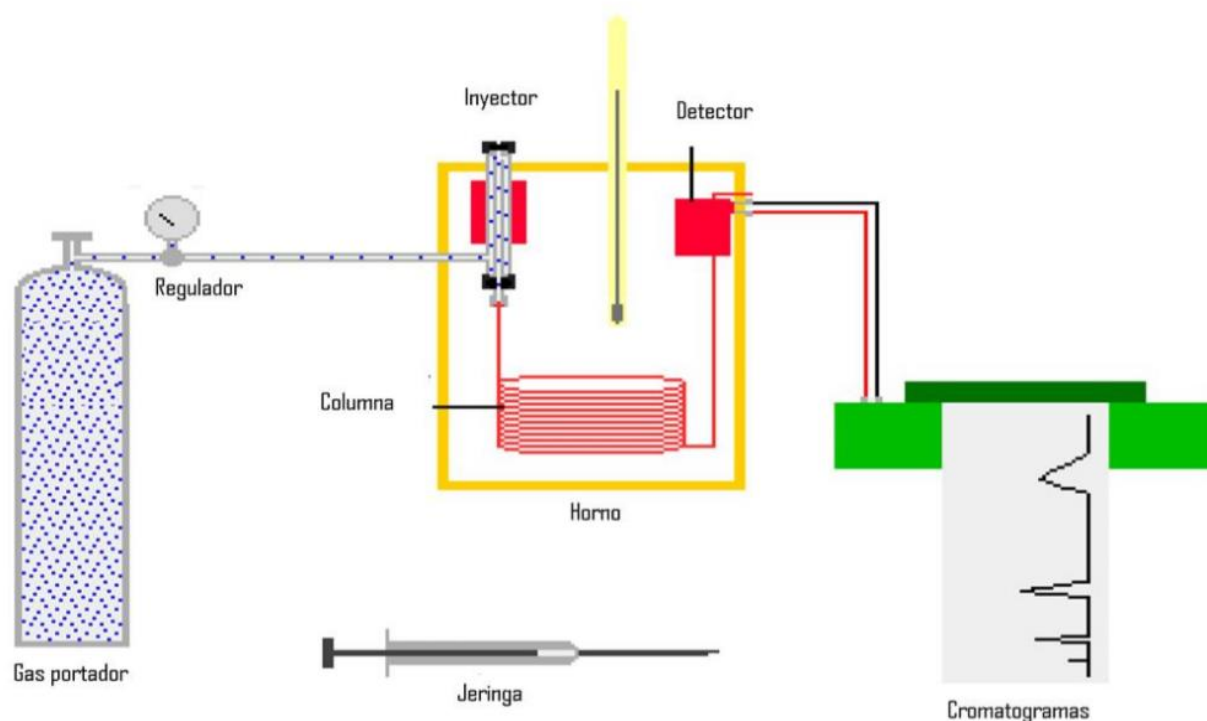


FIGURA 7: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases, son:

- a) Fuente de gas
- b) Sistema de inyección
- c) Horno y columna cromatográfica
- d) Sistema de detección
- e) Sistema de registro

Los principales componentes en un sistema de cromatografía de gases (Figura) 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. (Diario Oficial de la Federación, 2017)

1.4.2.1 GAS PORTADOR:

Los gases portadores utilizados en cromatografía no afectan a la separación ya que no tienen ninguna influencia sobre los procesos de sorción – desorción o de partición que se produce en la columna, por lo que no afectan a la selectividad de esta; de cualquier forma, los términos de difusión en la fase móvil de la ecuación de Van Deemter, si dependen de la naturaleza del gas portador, por lo que las curvas de AEPT (Figura) serán ligeramente distintas para cada tipo de gas, lo que a su vez influirá sobre la velocidad óptima de la fase móvil y, en consecuencia los tiempos de análisis.

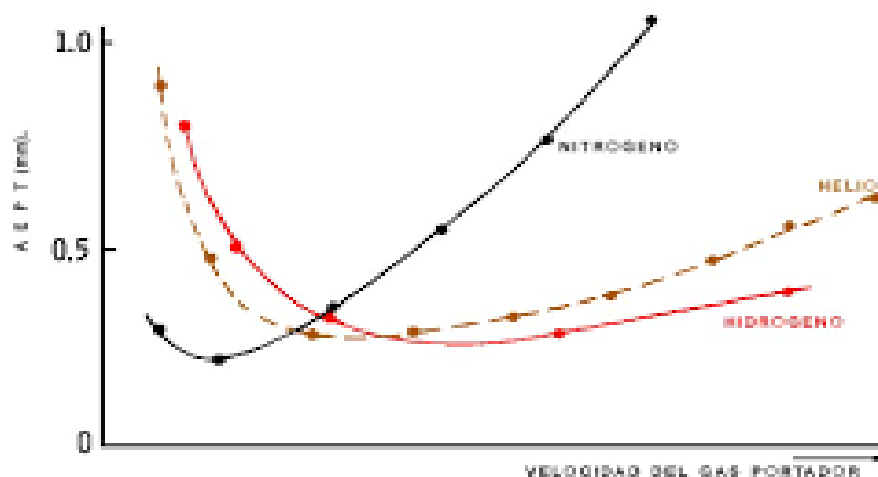


FIGURA 8: CURVAS DE AEPT PARA TRES GASES PORTADORES DE USO HABITUAL

Es el que cumple la función de fase móvil, el Helio es el más utilizado, pero también se utilizan otros como el Nitrógeno (N₂), Hidrógeno (H), los mismos que vienen en tanques presurizados con reguladores de presión, calibradores y medidores para controlar la velocidad en el flujo y con una pureza mayor al 99.95% para evitar alguna alteración dentro de las corridas del cromatógrafo de gases.

Al margen del efecto que la naturaleza del gas portador puede ejercer sobre la altura de plato, la elección de uno u otro tipo de gas, estará determinada fundamentalmente por el sistema de detección utilizado.

Como fuentes de gas portador se suelen utilizar cilindros de gas comprimido de elevada pureza, capaces de suministrar una presión de gas adecuado y constante; en muchos casos es necesario eliminar las trazas de impurezas que pueda contener el gas (O_2 y H_2O fundamentalmente) que puedan afectar al sistema cromatográfico, por medio de filtros adecuados.

El control de velocidad del gas portador a través de la columna, se realiza por medio de válvulas que suministran un caudal constante (columnas empaquetadas) o que mantienen constante la presión en la cabeza de la columna (sistemas capilares).

El horno de un cromatógrafo de gases, tiene como misión mantener la columna termostatzada a una temperatura fijada a una gran presión (dentro de unos límites de $\pm 1^\circ C$) por otro lado, es necesario que el control de termostatzación del horno permita incrementar la temperatura de este a una velocidad prefijada y constante (trabajo de técnicas de temperatura programada), evidentemente, el primer requisito es fácil de cumplir, pero cuando se requiere trabajar con temperatura programada, el horno debe cumplir una serie de requisitos tales como tener una escasa inercia térmica (particularmente si es necesario realizar rampas de temperatura muy rápidas) y poseer un sistema de control de temperatura muy sofisticado que incluya la posibilidad de programar las posibles variaciones de temperatura del horno así como los tiempos a los que se han de realizarse.

1.4.2.2 SISTEMAS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS

Los dispositivos de inyección de muestras para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.

La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.

La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.

1.4.2.2.1 INYECTORES PARA COLUMNAS EMPAQUETADAS

La inyección de muestras en columnas empaquetadas no presenta problemas particulares; este tipo de columnas admiten cantidades de muestra relativamente elevadas, y la inyección de unos cuantos micro litros de muestra no conduce a una disminución apreciable de la eficacia de la columna.

La mayoría de los cromatógrafos comerciales utilizan las cámaras de inyección termostatzada (Fig).

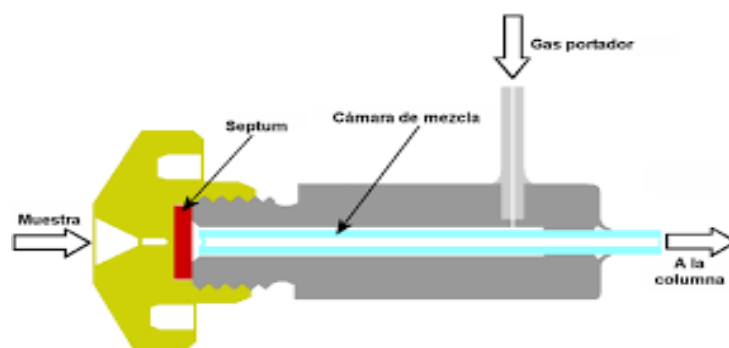


FIGURA 9: ESQUEMA DE UN INYECTOR PARA COLUMNAS EMPAQUETADAS

Un inyector está formado por un bloque metálico, buen conductor de calor, provisto de un sistema de calentamiento, un termostato capaz de mantener su temperatura constante y un aislamiento térmico adecuado; en el interior de este horno, se encuentra alojado el sistema de inyección (Fig 8). En este el gas portador, previamente calentado, pasa de forma continua en el sistema, la muestra es inyectada en el interior de la cámara, por medio de una micro jeringa de precisión, a través de un diafragma perforable (septum) con capacidad de auto sellado en el momento en que se retira la aguja; una vez inyectada la muestra, esta es vaporizada de forma instantánea, mezclándose con el gas portador, en una cámara de mezcla ("liner") construida de un material lo más inerte posible (acero inoxidable, nique, vidrio o cuarzo). Una vez vaporizada la muestra, es arrastrada rápidamente por la corriente de gas portador en dirección a la columna.

El diseño de la cámara de inyección debe ser estudiado minuciosamente, el volumen de la cámara ha de estar proporcionado con el tipo de columna a utilizar para evitar mezclas incompletas o bandas excesivamente anchas, en lo posible, es preciso evitar la formación de turbulencias en el paso de la cámara de inyección a la columna; se ha de evitar cuidadosamente la existencia de volúmenes muertos, no barridos por la corriente del gas portador, dentro de la cámara para evitar deformaciones de la banda de muestra, el volumen existente entre la cámara de inyección y la columna debe ser el menor posible para evitar ensanchamientos de banda; la temperatura ha de ser homogénea en toda la cámara de inyección para evitar la discriminación de alguno de los componentes de la muestra, etc.

El sistema de inyección de la muestra de un cromatógrafo es un punto extremadamente crítico y la utilización de una técnica de inyección inadecuada o una mala elección del sistema de inyección pueden echar a perder completamente la capacidad de separación de una columna.

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.

Existen algunos tipos de inyectoros que permiten utilizar uno de los extremos de la columna cromatográfica como cámara de mezcla. La introducción de la muestra por medio de este tipo de inyectoros (inyección en columna), está libre de muchos de los problemas mencionados anteriormente, además de ofrecer ventajas adicionales tales como permitir la utilización de temperaturas más bajas para la vaporización.

1.4.2.2.2 INYECTORES PARA COLUMNAS CAPILARES

Los sistemas de introducción de muestras utilizadas para trabajar con columnas capilares, están basados sobre los mismos principios de los inyectoros utilizados para columnas empaquetadas, por lo que las consideraciones generales sobre ellos siguen siendo válidas. La diferencia fundamental entre los sistemas que utilizan

columnas empaquetadas y los que utilizan columnas capilares, radica en que la cantidad de muestra que estas últimas pueden separar es mucho menor que en el primer caso, por otra parte, las columnas capilares son muy afectadas por los disolventes, de forma que los volúmenes que se pueden inyectar en ellas son extremadamente bajos, dado que no existen jeringas capaces de medir con precisión volúmenes inferiores a $0.1 \mu\text{L}$, los inyectores utilizados para trabajar con este tipo de columnas, además vaporizar la muestra y mezclarla con el gas portador, deberán ser capaces de introducir en la columna sólo una alícuota de la muestra total inyectada.

Existen muchas más técnicas de inyección para columnas capilares que para columnas empaquetadas las cuales se describirán a continuación.

1.4.2.2.3 INYECCIÓN CON DIVISIÓN DE MUESTRA

Este tipo de inyección (más conocida como inyección “split”), es el más sencillo de los que se utilizan en cromatografía capilar.

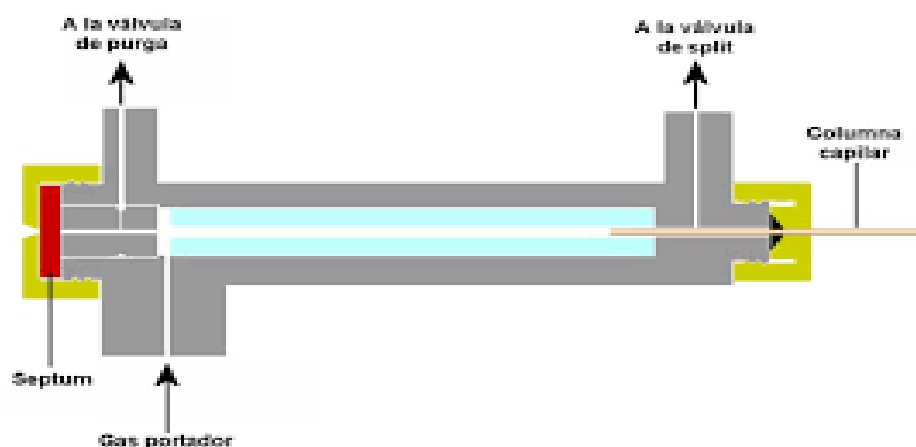


FIGURA 10: ESQUEMA DE UN INYECTOR DE “SPLIT”

El inyector “split” (fig. - 10), consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo de salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto también la muestra vaporizada), se divide en

dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la porción más pequeña de gas que es introducido en la columna. Dado que en este tipo de inyectores la mayor parte del caudal del gas portador se dirige hacia la atmósfera, la válvula de “split” dispone de un sistema de apertura y cierre automáticos para que únicamente permita la salida de gas hacia la atmósfera durante el proceso de inyección. El control de flujo de gas portador que pasa a través de la columna, se realiza en este tipo de sistemas manteniéndose constante la presión de la cámara de inyección, lo que permite que el caudal de gas que pasa a través del inyector pueda variar en función de que la válvula de “split” esté abierta o cerrada.

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes:

La división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas, por lo que los límites de detección aumentan bastante, lo que es un gran inconveniente a la hora de realizar análisis de trazas.

Por otro lado, los inyectores “Split” pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra.

1.4.2.2.4 INYECCIÓN SPLITLESS

En la técnica de inyección “splitless”, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra.

La totalidad de la muestra inyectada, lógicamente se condensa en la cabeza de la columna, actuando en este caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurrido un tiempo adecuado, en el inyector una válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector; al mismo tiempo, se comienza un programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis.

La utilización de la técnica de “splitless” supone dos ventajas importantes, uno de ellos que no existe división de la muestra, permitiendo un incremento notable en la sensibilidad, por lo que es muy adecuado en el análisis de trazas.

Por otra parte, la reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna origina que las pérdidas de eficacia debidas a una inyección inadecuada sean de mucha menor importancia que en otras técnicas de inyección.

El diseño de un inyector de “splitless” es básicamente el mismo que el del inyector de “split” (fig. - 10), pudiéndose realizar la purga del inyector a través de la válvula de Split, ya sea a través de una válvula de purga adicional situada cerca del septum. La mayoría de los inyectores de “split” comerciales, están diseñados para poder trabajar también en modo “splitless”.

1.4.2.2.5 INYECCIÓN EN COLUMNA

Uno de los principales problemas de los sistemas de inyección utilizados con columnas capilares, es la posibilidad de discriminación entre los componentes de la muestra durante los procesos de vaporización de la muestra y paso de la muestra vaporizada a la columna. La única forma de asegurarse que la muestra que alcanza la columna corresponde al 100% de la muestra inyectada, realizando la inyección de la muestra directamente en la columna.

Los sistemas de inyección en columna (normalmente conocido por su nombre en inglés como “on-column”), han sido diseñados para posibilitar la introducción de muestras directamente en el interior de las columnas capilares.

La introducción de una muestra por medio de una jeringa directamente en el interior de una columna capilar (de 0.23 mm de diámetro interno), requiere la utilización de agujas extremadamente finas (suelen utilizarse agujas de sílice fundida de 0.15 mm de diámetro) que, en consecuencia, son incapaces de perforar un septum.

La característica básica de un inyector “on-column” (fig. - 11), es la utilización de un sistema de válvulas y tubos de guía que permitan la introducción en el sistema de una aguja extremadamente fina.

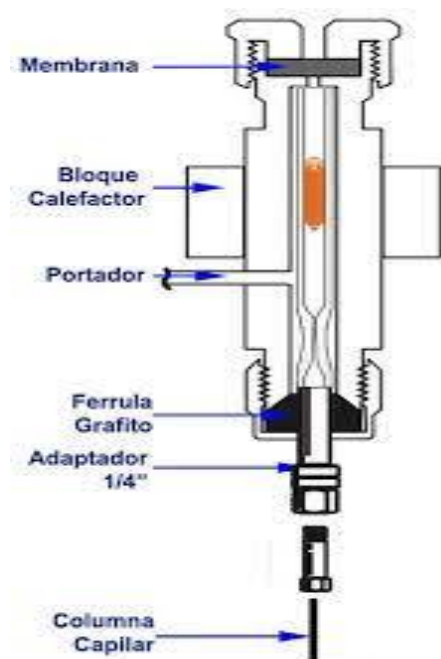


FIGURA 11: ESQUEMA DE UN INYECTOR "ON-COLUMN"

El método de trabajo utilizado en la inyección "on-column" recuerda en alguna forma al utilizado en la inyección "splitless", la muestra es introducida directamente en la columna, manteniéndose ésta a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra.

Una vez introducida la muestra, se inicia el programa de calentamiento de la columna para proceder la separación.

La gran ventaja que ofrece el sistema de inyección "on-column", es que reduce la discriminación entre los componentes de la muestra prácticamente a cero, obviándose además todos los problemas que presentan las restantes técnicas de inyección.

1.4.3 COLUMNA CROMATOGRÁFICA

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 con mayor eficiencia. Las columnas varían de

longitud desde 2 metros hasta 60 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 común mente llamado rampeo, en donde se incrementa la temperatura de forma continua o escalonada, según avanza la separación.

Al igual que sucede en todas las técnicas cromatográficas, la columna es el corazón del cromatógrafo de gases. Es necesario tener siempre presente que la columna es el auténtico elemento de separación de los componentes de la muestra, así una mala elección de la columna, una columna deteriorada o unas condiciones de trabajo inadecuadas, nunca permitirán obtener buenos resultados aunque se disponga del mejor equipo en el resto del cromatógrafo, siendo además las causas citadas las responsables de la inmensa mayoría de los problemas que se encuentran a la hora de realizar un análisis por cromatografía de gases.

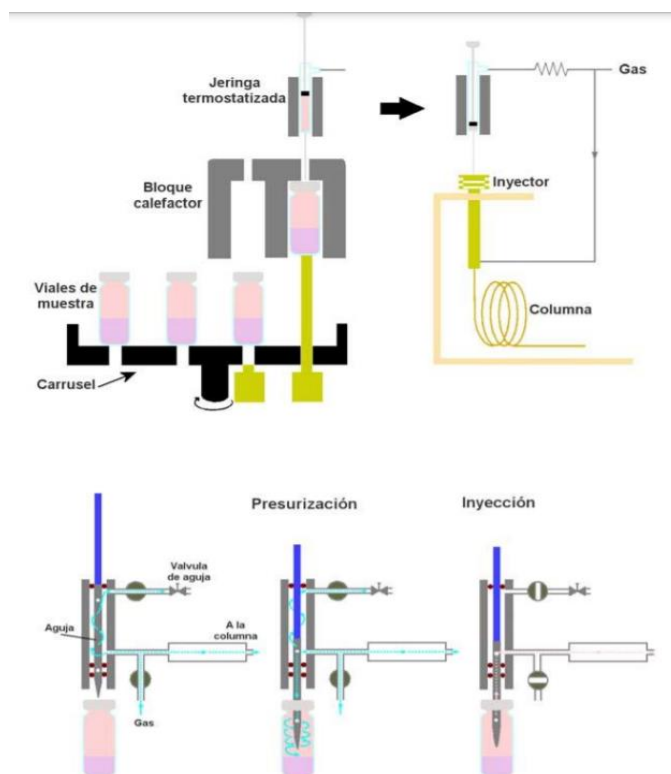


FIGURA 12: SISTEMAS DE INYECCIÓN DE ESPACIO DE CABEZA

Una columna para cromatografía de gases, está formada por un tubo, que puede ser de diversos materiales preferiblemente inertes, dentro del cual se encuentra la fase estacionaria.

Esta puede ser un sólido activo (cromatografía gas-sólido), o con mayor frecuencia un líquido depositado sobre las partículas de un sólido portador (columnas empaquetadas o de relleno) o sobre las propias paredes del tubo (columnas tubulares abiertas).

1.4.3.1 COLUMNAS EMPAQUETADAS

Las columnas empaquetadas consisten de un tubo de vidrio o acero inoxidable con un diámetro interno que varía entre 2 y 5 mm y de una longitud que oscila entre 1 a 15 m, arrollado de una forma adecuada para introducir en el interior del horno del cromatógrafo (figura 13).

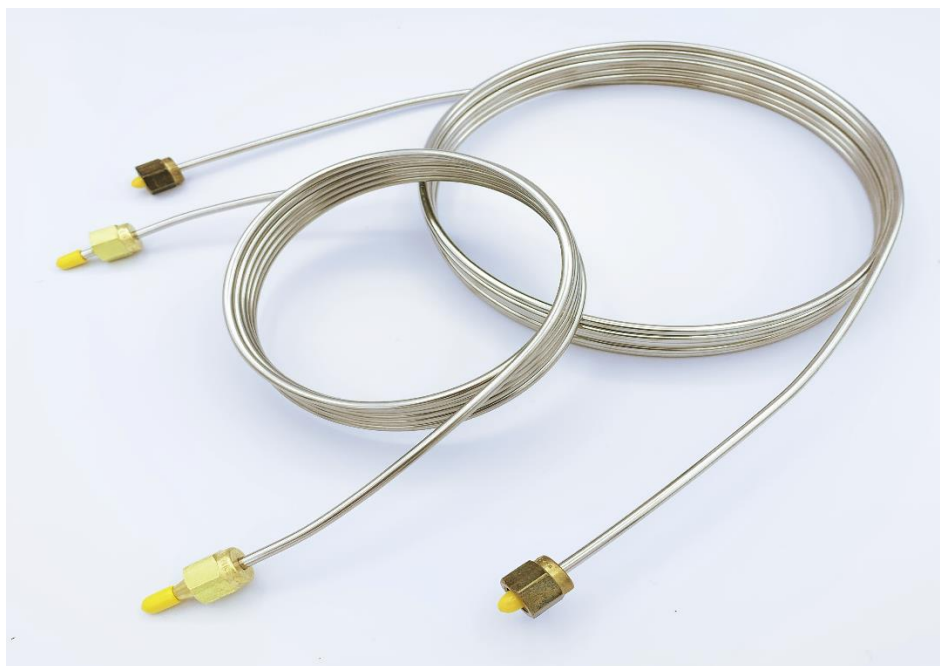


FIGURA 13: COLUMNAS EMPAQUETADAS PARA CROMATOGRFÍA DE GASES

En el interior del tubo, se dispone de la fase estacionaria bajo la forma de un líquido soportado sobre un material adecuado finamente pulverizado, el diámetro de las partículas de relleno debe ser, al menos, diez veces inferior al diámetro del tubo, con el fin de conseguir una buena uniformidad en su distribución. El relleno se encuentra confinado en el interior del tubo por medio de tapones de un material poroso de lana de vidrio o lana de cuarzo situado en los extremos.

La longitud y consecuentemente la eficacia de las columnas empaquetadas se encuentra limitada fundamentalmente por la caída de presión del gas portador entre la cabeza y salida de la columna.

1.4.3.2 COLUMNAS TUBULARES ABIERTAS

Las columnas tubulares abiertas conocidas también como columnas capilares fueron descritas inicialmente por Golay en 1957 y son las más utilizadas debido a su gran eficacia de separación que proporcionan. Una columna tubular está formada por un tubo de vidrio o de sílice fundida de un diámetro comprendido entre 0.2 y 0.8 mm, en cuya pared interna se dispone la fase estacionaria. Según sea la forma en que se

dispone la fase estacionaria sobre la pared del tubo, se distinguen básicamente dos tipos de columnas (figura 14):

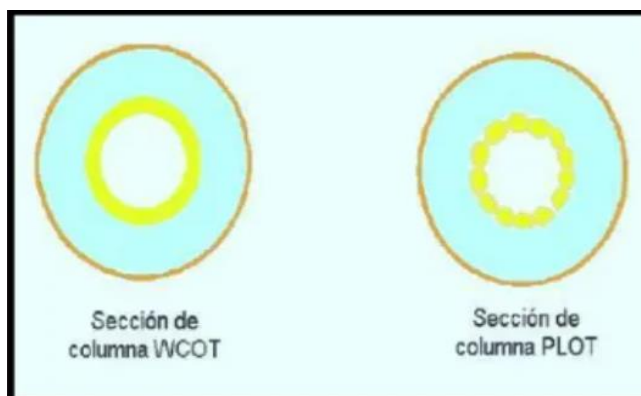


FIGURA 14: TIPOS DE COLUMNA TUBULARES ABIERTAS.

a.- Columnas WCOT (Wall Coated Open Tubular). En este tipo de columnas (que son de uso más frecuente), la fase estacionaria se encuentra depositada formando una película líquida directamente sobre las paredes del tubo.

b.- Columnas PLOT (Porous Layer Open Tubular). En estas columnas la pared interna del tubo está recubierta por una capa de un soporte adsorbente; si a su vez el soporte está impregnado con una fase estacionaria líquida, las columnas son denominadas SCOT (Support Coated Open Tubular).

Es evidente que la permeabilidad de las columnas tubulares hacia los gases es mucho mayor que la de las columnas empaquetadas, del orden 100 veces mayor, por lo que este tipo de columnas pueden tener una longitud bastante grande, son muy frecuentes columnas de 50 m, sin provocar presiones excesivamente elevadas en la cabeza de la columna.

El enorme uso que se hace de este tipo de columnas es debido fundamentalmente a la elevada eficacia que ofrecen, son frecuentes valores de 30 00 a 50 00 platos frente a los 2 00 a 4 000 de una columna empaquetada, entonces permite la separación de mezcla muy complejas con relativa facilidad; por otra parte, la gran eficacia de este tipo de columnas permite conseguir buenas resoluciones sin recurrir a fases

estacionarias de gran selectividad, lo que simplifica la elección de la fase estacionaria.

El principal inconveniente de este tipo de columnas es su pequeña capacidad de carga, lo que obliga a utilizar sistemas de inyección especiales para introducir pequeñas cantidades de muestra y detectores de muy alta sensibilidad, no obstante, tanto las columnas SCOT como las WBOT de diámetros mayores de 0.5 mm (columnas “Wide Bore”) ofrecen una capacidad de carga suficiente como para poder inyectar cantidades del orden de 1 μ L sin utilizar un splitter con una pérdida de eficacia relativamente pequeña.

Las columnas de este tipo tienen una utilización muy alta en el campo de análisis de trazas.

1.4.4 FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria en cromatografía de gases juega un papel fundamental, ya que la fase móvil es cromatográficamente inerte y las separaciones son debidas exclusivamente a las interacciones específicas que se dan entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.

Las propiedades de una fase estacionaria con frecuencia son contradictorias, por lo que no existe una fase estacionaria ideal.

Las propiedades que debe cumplir una fase estacionaria son:

Debe tener el rango de temperaturas de utilización lo más amplio posible, idealmente entre – 60 y 400 °C.

La presión de vapor debe ser lo más baja posible.

Debe ser térmicamente estable.

Debe ser químicamente inerte.

Debe tener baja viscosidad en las condiciones de trabajo.

Debe mojar bien el soporte, presentando además una adherencia suficiente como para que no sea arrastrada por la fase móvil.

Además de cumplir estos requisitos generales, la fase estacionaria debe ser selectiva frente a los compuestos a separar, es evidente que no existe ninguna fase estacionaria que cumpla con todos los requisitos anteriores, aunque para realizar separaciones a temperaturas elevadas, la utilización de polímeros líquidos de elevado peso molecular ofrece resultados bastante buenos.

A nivel molecular, la retención del soluto por la fase estacionaria se debe a cualquiera de los siguientes tipos de fuerza intermolecular:

1. Fuerzas de dispersión (fuerzas de London). Este tipo de fuerzas debidas a los campos eléctricos producidas por dipolos instantáneos debidos al movimiento relativo de los núcleos y electrones. Las fuerzas de dispersión son las únicas que actúan entre fases estacionarias y solutos no polares.
2. Fuerzas de inducción (fuerzas Debye). Este tipo de fuerzas son debidas a la interacción electrostática que se produce entre dipolos instantáneos, formados en moléculas no polares, aunque polarizables, inducidos por los primeros.
3. Fuerzas de orientación (fuerzas de Keesom). Son debidas a la interacción entre dipolos permanentes, tanto de la fase estacionaria como del soluto.
4. Fuerzas donador – aceptor. Son debidas a las interacciones químicas de carácter débil (enlace hidrógeno), en las que se produce una transferencia no completa de electrones por parte del donador hacia el aceptor.

Para compuestos no polares, las únicas fuerzas de interacción entre el soluto y la fase estacionaria son las dispersivas; este tipo de fuerzas no son selectivas, y en las separaciones basadas en este tipo de fuerzas los solutos emergen de la columna, por lo general en orden correspondiente a sus puntos de ebullición.

Para los compuestos polares, las interacciones de mayor importancia son las debidas a fuerzas de inducción y orientación; en algunos casos a interacciones electrónicas específicas de tipo donador – aceptor donde este tipo de fuerzas

dependen del momento dipolar y de la capacidad de polarización tanto de la fase estacionaria como del soluto.

La suma de todas estas interacciones entre un soluto y una fase estacionaria es una medida de la polaridad de la fase respecto al soluto que marca las características generales de retención, mientras que la magnitud de cada uno de los tipos de interacciones particulares marcará la selectividad de la fase estacionaria que es de gran importancia ya que permite separar una fase estacionaria concreta solutos de igual polaridad.

1.4.5 POLIETILENGLICOLES

Los polietilenglicoles son fases estacionarias muy útiles para la separación de compuestos polares y con posibilidades de formación de enlaces de hidrógeno. Este tipo de fases estacionarias se preparan por polimerización del óxido de etileno. Los polímeros así formados se separan en fracciones de diferente peso molecular promedio, lo que da lugar a todo el rango de fases estacionarias de este tipo.

El factor fundamental que marca las características de retención de este tipo de fases es la concentración de grupos hidroxilo y en menor grado el peso molecular promedio de la fase. Este último factor si tiene por el contrario una gran influencia sobre la estabilidad térmica de la fase; así, el Carbowax 20 M, con un peso molecular promedio de 14 000, tiene una temperatura máxima de utilización de 225 °C, mientras que el Superox-4, con un peso molecular promedio de 4 millones, es utilizable de hasta temperaturas de 300 °C. El principal inconveniente que presenta este tipo de fase estacionaria es la facilidad que tiene a oxidarse.

1.4.6 DETECTORES

Una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna, se hace preciso disponer a la salida de esta un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través de él.

Los detectores utilizados en cromatografía de gases son de tipo diferencial, no ofrecen señal cuando pasa por ellos solamente el gas portador y responden ante alguna propiedad que pueda variar cuando este se encuentra mezclado con alguna sustancia eluida en la columna.

1.4.6.1 DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)

El detector de ionización de llama, es más ampliamente utilizado en cromatografía de gases. Este tipo de detector es en la práctica de respuesta universal, ya que es selectivo hacia los compuestos que presenten enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él.

En un detector de ionización de llama, el gas procedente de la columna se mezcla con hidrógeno y esta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire. Por encima de la llama, se dispone un colector cilíndrico polarizado con el fin de recoger los iones generados; sobre este dispositivo, se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador y el electrodo colector. El esquema de un detector de ionización de llama se encuentra en la figura (páginas de abajo).

El mecanismo de generación de iones en este detector es complejo y no del todo conocido, ya que la energía de la llama es demasiado baja para explicar la generación de iones; generalmente, se cree que estos son generados por medio de un proceso de ionización química, en el que la energía liberada por reacciones fuertemente exotérmicas es retenida por las moléculas orgánicas, generándose iones a partir de las moléculas excitadas.

El detector de ionización de llama se polariza siempre con un voltaje de saturación; bajo estas condiciones, la corriente de fondo es del orden de 10^{-13} – 10^{-14} A, que se incrementa hasta un nivel de 10^{-12} – 10^{-9} A en presencia de un vapor orgánico.

Los detectores de ionización de llama ofrecen una elevada sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente elevado, junto con una gran sencillez de utilización ha hecho que este tipo de detectores, sean mucho más utilizados.

1.4.6.2 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 más aplicable y utilizado en cromatografía de gases (Figura 2), 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 (Diario Oficial de la Federación, 2017).



La cromatografía de gases se basa en la comparación de las áreas bajo las curvas 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.

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

1.4.8.1 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 ha logrado precisiones de 0,5 a 1 % según informes. (SKOOG & WEST, 2005)

1.4.8.2 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, 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.” (HARRIS, 2007)

Para la validación de un método analítico es necesario cumplir con ciertas exigencias que incluye la norma técnica ISO-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 auditoria
- 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. (CASTELLUCCI, 2015)

1.4.9 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 (HARRIS, 2007).

Los métodos seleccionados se deben normalizar, de esta forma se pueden corregir y hacer ajustes según sean necesarios para tener un funcionamiento consistente. (Diario Oficial de la Federación, 2017)

1.4.9.1 PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN.

1.4.9.1.1 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.

1.4.9.1.2 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. (Foot and Drugs Administration, 2000)

1.4.9.1.3 SENSIBILIDAD:

Término 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. (SKOOG & WEST, 2005)

Precisión. - La precisión está 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 (Crubellati R., 2009).

1.4.9.1.4 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

1.4.9.1.5 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. (Foot and Drugs Administration, 2000)

1.4.9.1.6 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 (Skoog, 2001).

1.4.9.1.7 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 (SKOOG & WEST, 2005)

1.4.9.1.8 EXACTITUD:

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

1.4.9.1.9 Rango de trabajo:

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

1.4.9.1.10 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.

1.4.9.1.11 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. (Diario Oficial de la Federación, 2017)

1.4.9.1.12 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.

1.4.10 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 (Biológicos, 2002).

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

1.5 FUNDAMENTO TEÓRICO

El método de calibración es un procedimiento analítico muy utilizado en análisis cuantitativo en química analítica que implica la construcción de una “curva de calibración” para determinar la concentración de una sustancia (analito) en una muestra problema. Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. Conociendo esta relación funcional, será posible conocer la concentración en una muestra dada mediante la medida de esa señal.

En particular, en esta unidad abordaremos el tema de la calibración analítica mediante el *modelo lineal*, y veremos algunas estrategias para asegurar que el modelo lineal es correcto y adecuado a nuestras necesidades.

Se necesita de la calibración en Química Analítica, porque se necesita una escala con la cual después medir la concentración de un compuesto de interés en una muestra.

Hay técnicas que no requieren calibración, son pocas, pero existe. Una de ellas es la gravimetría, una técnica que consiste en pesar directamente en una balanza el compuesto que nos interesa. Pero para eso el compuesto tiene que estar puro. Aislar un compuesto puro es complicado y por eso la aplicación de la gravimetría está limitada.

En general, la mayoría de los químicos analíticos tienen que calibrar. Y es la calibración. La calibración es un modelo matemático que genera una escala con la cual medir la concentración del compuesto de interés (*el analito*). Y para eso necesitamos una serie de medidas instrumentales (con un equipo que puede ser óptico, eléctrico o de otra naturaleza) sobre un conjunto de muestras *–de calibración–* donde interviene el compuesto de interés en estado puro y en concentraciones conocidas y con las medidas realizadas a esas muestras de calibración se genera un modelo. El modelo después se aplica a una muestra de ensayo *–incógnita–*, y en

esa muestra incógnita se logra el objetivo de determinar la concentración del compuesto de interés.

Por lo tanto, a grandes rasgos, podemos considerar que la calibración tiene dos etapas:

La de calibración propiamente dicha.

La de la predicción o de la estimación de la concentración del analito en la muestra de interés.

Es importante destacar que, el análisis mediante recta de calibración, puede hacerse cuando solo el analito presenta señal analítica o respuesta (absorbancia, fluorescencia, potencial eléctrico, corriente, etc.), o cuando la señal del blanco es constante.

Existen tres tipos de calibraciones en química analítica:

- Clásica o univariada
- Multivariada
- Multimodo o multivía

Un único dato (escalar) medido para una muestra analítica dada se clasifica como univariada, mientras que múltiples datos instrumentales registrados para una única muestra se consideran multivariados. Cuando los datos multivariados para una muestra pueden organizarse en una tabla o matriz de datos con dos dimensiones diferentes, o cuando los datos para un conjunto de varias muestras se pueden organizar en un objeto matemático de al menos tres dimensiones (arreglo tridimensional), se dice que pertenecen a la clase multivía.

Gráficas de calibrado en análisis instrumental.

El procedimiento habitual es el siguiente. El analista toma una serie de materiales (normalmente al menos tres o cuatro, y posiblemente algunos más) de los que se conoce la concentración de analito (disoluciones patrón o estándar). Estos patrones

de calibración se miden en el instrumento analítico bajo las mismas condiciones que las utilizadas posteriormente para los materiales de ensayo (es decir, los «desconocidos»). Una vez establecida la gráfica de calibrado, puede obtenerse la concentración de analito por interpolación en cualquier material de ensayo.

Así vemos que las etapas o pasos que deben seguirse en un análisis mediante recta de calibración son:

Etapas de calibración:

Determinación del extremo superior del rango lineal.

Preparación de los patrones.

Medición de la respuesta de los patrones.

Estimación de los parámetros de la regresión.

Cálculo de las cifras de mérito del método.

Etapas de predicción.

Estimación de la concentración del analito en la muestra de interés.

Este procedimiento general plantea varias cuestiones estadísticas importantes:

Teniendo en cuenta que cada uno de los puntos de la línea de calibrado está sujeto a errores.

Cuando el gráfico de calibrado se usa para el análisis de un material de ensayo,

Antes de abordar estas cuestiones detalladamente, veamos algunas consideraciones importantes en el trazado de las líneas de calibrado.

1.5.1 ALGUNOS ASPECTOS IMPORTANTES EN EL TRAZADO DE LAS LÍNEAS DE CALIBRADO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES.

En primer lugar, resulta habitualmente esencial que los patrones de calibrado cubran el intervalo completo de concentraciones requerido en subsiguientes

análisis. Con la importante excepción del *método de las adiciones estándar*, que es tratado aparte en una sección posterior, la concentración de los materiales de ensayo se determina normalmente por interpolación y no por extrapolación.

Siempre el punto cero o valor de un *blanco* se debe incluir en la curva de calibrado. El blanco no contiene ningún analito adicionado deliberadamente, pero contiene los mismos disolventes, reactivos, etc., que los otros materiales de ensayo, y está sujeto exactamente a la misma secuencia del procedimiento analítico. La señal del instrumento dada por el blanco a veces no será cero. Esta señal está sometida a errores, como los demás puntos del gráfico calibrado, y no tiene sentido, en principio, restar el valor del blanco de los otros valores estándar antes de dibujar la curva de calibrado. Esto es debido a que, como vimos cuando estudiamos *Propagación de incertidumbres*, cuando se restan dos cantidades, la incertidumbre en el resultado final no puede obtenerse por simple resta. La resta del valor del blanco de cualquier otra señal del instrumento antes de dibujar el gráfico proporciona una información incorrecta de las incertidumbres del proceso de calibración.

Finalmente, se debe subrayar que la curva de calibrado se establece siempre con la respuesta del instrumento en el eje vertical (Y) y la concentración del patrón sobre el eje horizontal (X). Esto es debido a que muchos de los procedimientos que se describen en las secciones siguientes suponen que todos los errores residen en los valores de Y, y que las concentraciones de los patrones (valores de X) se encuentran libres de error.

1.5.1.1 Determinación del rango lineal.

Esta etapa es fundamental, ya que la regresión lineal está basada en la suposición de que los datos de respuesta analítica están linealmente relacionados con la concentración del analito. Si se sospecha que existen desvíos de la linealidad, se recomienda realizar un análisis exploratorio previo cuyo objeto es extender el rango de aplicabilidad de la técnica analítica a la máxima concentración posible. En dicho

análisis, se incluyen patrones de concentración conocida del analito desde cero hasta valores que se desvíen visiblemente de la linealidad. Una prueba estadística apropiada permitirá luego decidir hasta qué concentración se cumple la relación lineal respuesta-concentración. Sin embargo, dado que los parámetros a emplear en esta prueba se obtienen del análisis matemático-estadístico de la regresión, diferiremos el cálculo detallado para más adelante.

1.5.1.2 Preparación de patrones.

Una vez estimado el extremo superior del rango lineal de la técnica, deben prepararse patrones de concentración conocida dentro de dicho rango, e incluyendo el valor cero de concentración del analito (blanco). Usualmente, se preparan varios patrones (como mínimo cinco) con concentraciones igualmente espaciadas entre cero y el extremo superior del rango lineal, y cada patrón se analiza por triplicado.

Debe ponerse especial cuidado en la preparación de los patrones del analito para la calibración, de manera que las concentraciones de calibrado se conozcan con la máxima precisión posible. Este requisito se relaciona con el hecho de que la recta de regresión se ajusta mediante ecuaciones que suponen que los valores del eje x (concentraciones) tienen una incertidumbre considerablemente menor que los del eje y (respuestas).

Solo a modo de ejemplo, si se realizan mediciones de absorbancia como respuesta, podemos suponer que el nivel de incertidumbre en la respuesta puede ser de alrededor de 0.005 unidades de absorbancia. Si los valores de las respuestas son, en promedio, de 1 unidad de absorbancia, esto implica un nivel relativo de incertidumbre de aproximadamente 0.5% en la respuesta. Por lo tanto, se deben preparar patrones de calibrado cuyas concentraciones se conozcan con un error menor al 0.5%. Preparar soluciones de calibrado, por ejemplo, con incertidumbres del orden del 0.1% en promedio, requiere pesar más de 100 mg de reactivo, preparar soluciones en matraces calibrados de al menos 100 mL, tomar alícuotas con pipetas aforadas calibradas, etc.

1.5.1.3 Medición de la respuesta de los patrones.

Una vez preparados los patrones de concentración conocida, se miden sus respuestas analíticas, incluyendo réplicas de cada medición. Usualmente cada patrón se mide por triplicado.

Notación: A lo largo del apunte, utilizaremos la siguiente notación para indicar la cantidad de patrones y cantidad de mediciones en total. Por ejemplo, si se emplean 6 patrones, cada uno por triplicado, entonces el número de niveles diferentes de concentración (k) es 6, y el número total de puntos de la recta de calibrado (N) es 18.

1.5.2 Modelo lineal.

El uso de una recta de calibración para determinar la concentración de un analito en una muestra es una aplicación importante de la regresión lineal. Como lo mencionamos en la sección precedente, la variable Y representa las medidas de respuesta (señal del instrumento) y la variable X la concentración de las soluciones estándar. Los errores cometidos en la preparación de las soluciones estándar suelen ser insignificantes en comparación con los errores de medición. Por lo tanto, la suposición de que la variable X se conoce exactamente y, en consecuencia, no tiene error, está justificada en la calibración. La variable X es entonces la variable independiente (*predictora*) e Y la variable dependiente (*respuesta*).

La función de calibración se puede obtener ajustando un modelo matemático adecuado a través de los datos experimentales.

En términos generales, suponemos el siguiente modelo para la respuesta experimental observada

$$Y=f(X)+\epsilon$$

donde $f(X)$ es la curva de calibración que tenemos que estimar. Para hacer esto, necesitamos N observaciones, y_i de k estándares diferentes. Por supuesto que, si no hay observaciones replicadas, $N=k$, en otro caso $N>k$. Para cada valor

observado y_i la correspondiente concentración del estándar la denotamos x_i , sin distinguir si son iguales (réplicas) o no. Por lo tanto

$$y_i = f(x_i) + \varepsilon_i, i=1, \dots, N.$$

En muchos problemas de calibración se consideran las siguientes hipótesis cuya compatibilidad con los resultados experimentales debemos comprobar cuidadosamente:

a. La verdadera función de calibración f es lineal en el *rango de concentraciones* estudiado. Por lo tanto

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i, i=1, \dots, N. \quad (\text{Eq. 1})$$

b. Los valores de la variable predictora ($x_i, i=1, \dots, N$) son **valores controlados** y su incertidumbre experimental puede despreciarse en comparación con la incertidumbre en la determinación de la respuesta.

c. Los errores en la respuesta observada son independientes, tienen media cero, $E(\varepsilon_i) = 0$ y la misma varianza, $\text{Var}(\varepsilon_i) = \sigma^2$, para $i=1, \dots, N$

La evaluación y análisis de los estimadores de los parámetros en una calibración (β_0 , β_1 y $S^2_{y|x}$) es un problema de inferencia estadística porque todos los estimadores son variables aleatorias que dependen de la distribución del error ε . El único supuesto necesario sobre la distribución de los errores en el método de mínimos cuadrados es que tienen una varianza constante σ^2 independiente de la concentración x_i . Sin embargo, si queremos inferir estadísticamente algo sobre los parámetros correspondientes, es necesario disponer de información adicional sobre su distribución.

Por este motivo, adicionalmente consideramos los siguientes supuestos

d. los datos están distribuidos normalmente y, en consecuencia, para cada x_i , la respuesta experimental es una variable aleatoria normal ($Y|X=x \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_i, \sigma^2)$).

La Figura 16 ilustra el significado de las hipótesis asumidas: para cada concentración x_i y debido al carácter aleatorio de ε , se puede obtener cualquier valor de la señal, pero los valores cercanos a $\beta_0 + \beta_1 x_i$ son más probables, por ser este el valor medio esperado cuando se usa una función de densidad de probabilidad de una distribución normal, independiente de una concentración a otra y con varianza común σ^2 .

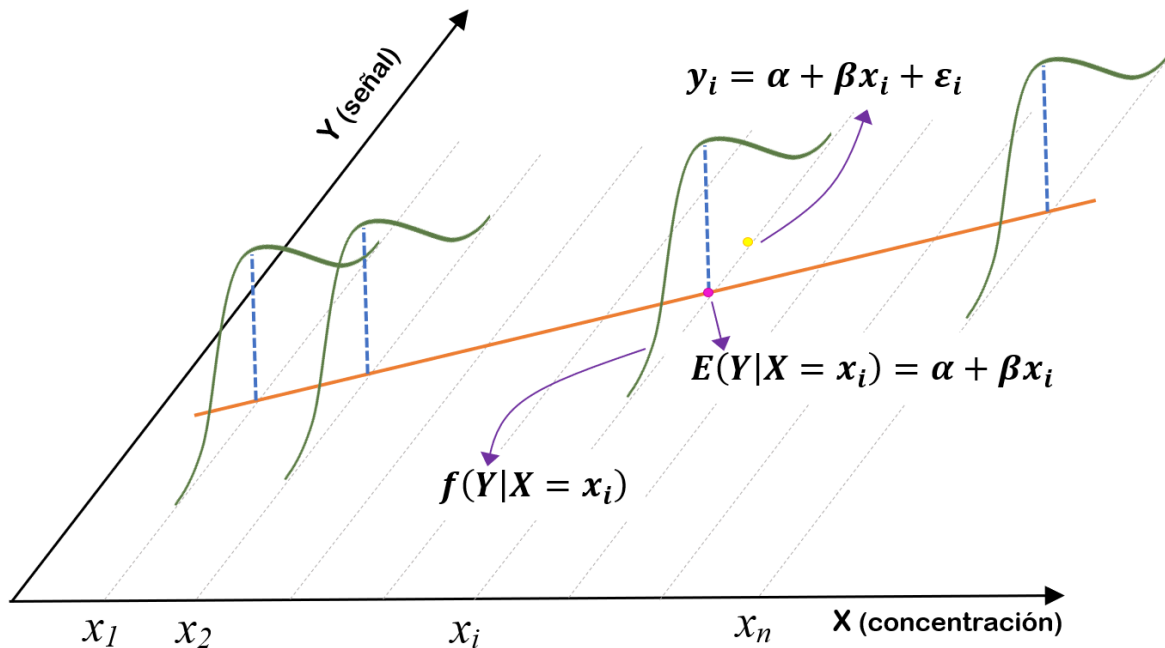


FIGURA 16. MODELO DE CALIBRACIÓN DE EQ. (1), ASUMIENDO QUE LA SEÑAL REGISTRADA PROVIENE DE LA DISTRIBUCIÓN NORMAL

Proponer un modelo de calibración específico, como el de la Ecuación (Eq.1), para algunos datos experimentales es consecuencia del conocimiento teórico del problema, pero su validez debe verificarse sobre la base de un examen crítico de los resultados experimentales. El modelo $f(x)$ es una hipótesis de trabajo y debe modificarse si los datos experimentales están en contra.

Cuando decimos que un modelo es lineal o no lineal, nos referimos a la linealidad o no linealidad en los coeficientes. El valor de la mayor potencia de una variable predictora en el modelo se denomina orden del modelo. Por ejemplo,

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \beta_2 x_i^2 + \epsilon_i, i=1, \dots, N. \quad (\text{Eq.2})$$

es un modelo de regresión lineal (en las β 's) de segundo orden (en x). El modelo de calibración de la Ecuación (Eq.2) es cuadrático; no es una calibración lineal, pero sino una regresión lineal.

1.5.3 Estimación por mínimos cuadrados

El método de mínimos cuadrados ordinarios (*OLS* por sus siglas en inglés -*Ordinary Least Squares*-) no requiere ninguna hipótesis sobre la distribución de los errores, ϵ en la Eq. 1. Para obtener las estimaciones β_0 y β_1 de β_0 y β_1 , respectivamente, se determina la recta que mejor describe los datos experimentales. El argumento es el siguiente: para cada par de valores a y b , se obtiene una recta diferente, $y=a+bx$, cuyos residuos son $e_i=y_i-y_i$; $i=1, \dots, N$. Los estimadores *OLS* de β_0 y β_1 son los valores que minimizan la suma de cuadrados de estos residuos (SSE),

$$\text{SSE}(a,b) = \sum_{i=1}^N e_i^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - a - b x_i)^2 \quad (\text{Eq.3})$$

La recta que se obtiene al minimizar SSE en función de a y b es la que minimiza la suma de las distancias “en vertical” entre los datos experimentales y los estimados con la línea ajustada (ver Figura 17).

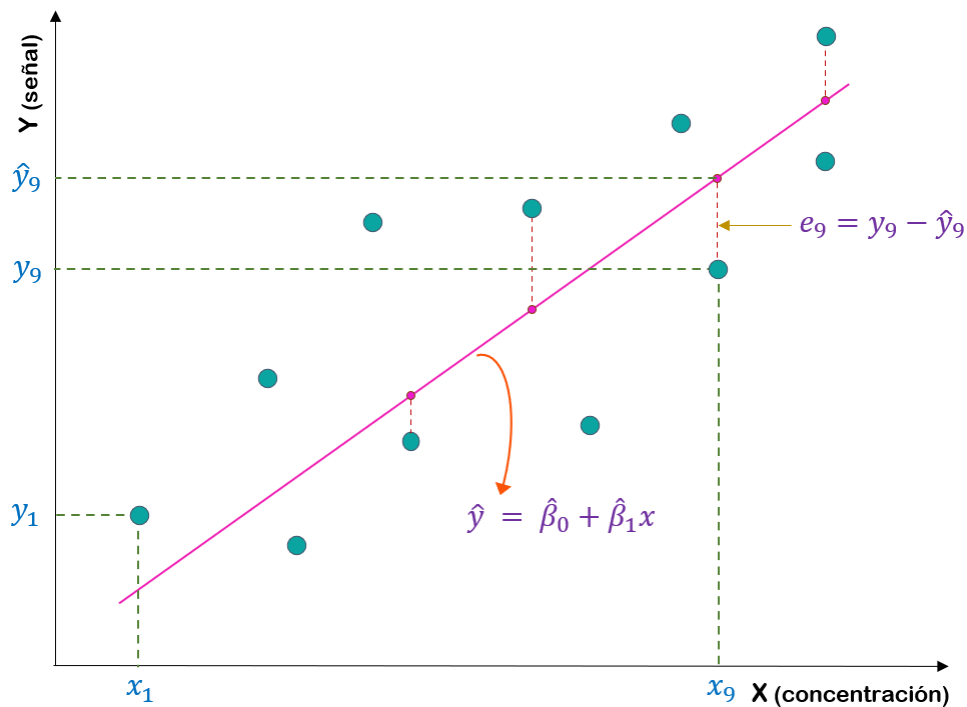


FIGURA 17: ILUSTRACIÓN DEL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS: LA RECTA DE CALIBRACIÓN AJUSTADA ES LA QUE MINIMIZA LA SUMA DE CUADRADOS DE TODAS LAS DISTANCIAS VERTICALES e_i .

Es evidente que, si un conjunto de N residuos es grande, entonces el ajuste del modelo no es bueno. Residuos pequeños son indicadores de un ajuste adecuado. Notemos que, de la definición del residuo e_i se deduce que

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i, i=1, \dots, N. \quad (\text{Eq.4})$$

La Ecuación (Eq.4) debería aclarar la diferencia entre los residuos e_i y los errores aleatorios ε_i del modelo (Eq.1).

La Figura 18 muestra la recta ajustada a partir de un conjunto de datos, a saber $\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x$, y la recta que refleja el modelo, $\mu_{Y|X} = \beta_0 + \beta_1 x$. Desde luego, β_0 y β_1 son parámetros desconocidos. La recta ajustada es una estimación de la recta correspondiente al modelo estadístico.

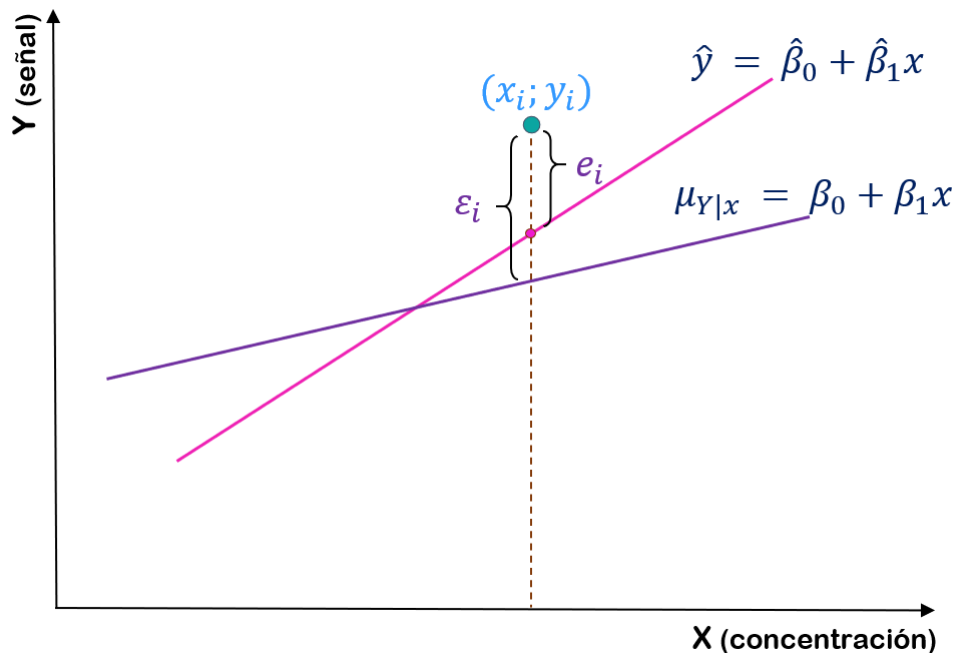


FIGURA 18: COMPARACIÓN DE E_i CON EL RESIDUO e_i .

Se puede probar analíticamente que la función $SSE(a,b)$ en la Ecuación (Eq.3) tiene un mínimo único (excepto cuando $x_1=x_2=\dots=x_N$, una situación claramente sin sentido en calibración) que puede determinarse explícitamente. Esta solución proporciona los estimadores *OLS* que, como ya hemos visto, vienen dados por las ecuaciones

$$\beta_1 = (\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) / \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2) = (\text{Cov}(x,y) / S^2_x) = S_{xy} / S^2_x \quad (\text{Eq.5})$$

$$\beta_0 = \bar{y} - \beta_1 \bar{x} \quad (\text{Eq.6})$$

donde el promedio de las y_i , $\bar{y} = 1/N (\sum_{i=1}^N y_i)$, el promedio de las x_i y S^2_x denota la varianza muestral de las x 's

La línea determinada por estas ecuaciones se conoce como recta de regresión de Y sobre X , es decir, la recta que indica cómo varía Y cuando X se ajusta a los valores elegidos. Es muy importante hacer constar que la recta de regresión de X sobre Y *no es la misma recta* (excepto en el caso muy improbable en que todos los puntos caigan sobre una línea recta, exactamente cuándo $r=1$ o $r=-1$). La

recta de regresión de X sobre Y supone que todos los errores ocurren en la dirección de X. Si se mantiene rigurosamente el convenio que la señal analítica se representa siempre sobre el eje Y y la concentración sobre el eje X, la recta de regresión de Y sobre X es la que se debe usar siempre en los experimentos de calibración.

El método *OLS* no proporciona una estimación para σ^2 . Sin embargo, esta puede obtenerse a partir de la suma de cuadrado de los residuos y basándose en las estimaciones *OLS* de β_0 y β_1 . Llamamos a σ^2 varianza de la regresión, es habitualmente denotada por $S^2_{Y|x}$ y está definida por

$$S^2_{Y|x} = 1/(N-2) \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_i)^2 = (1/(N-2)) \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 = (1/(N-2)) \sum_{i=1}^N e_i^2 \quad (\text{Eq.7})$$

El parámetro σ^2 refleja la variación aleatoria o variación del error experimental alrededor de la recta de regresión.

1.5.3.1 Errores en la pendiente y ordenada en el origen de la recta de regresión

Para estimar las incertidumbres (expresadas como desviaciones estándar) de la pendiente y la ordenada en el origen, analicemos la de incertidumbre de las ecuaciones (Eq.5) y (Eq.6).

En primer lugar, notemos que los estimadores $\hat{\beta}_0$ y $\hat{\beta}_1$ son combinaciones lineales de las y_i 's. En consecuencia, sus incertidumbres están relacionadas con la incertidumbre al medir los valores de Y. En efecto:

$$\hat{\beta}_1 = \sum_{i=1}^N x_i - \bar{x} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 y_i = \sum_{i=1}^N c_i y_i$$

donde $c_i = x_i - \bar{x} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$ y por lo tanto

$$\begin{aligned} \text{Var}(\hat{\beta}_1) &= \text{Var}(\sum_{i=1}^N c_i y_i) \\ &= \sum_{i=1}^N [x_i - \bar{x} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2]^2 \text{Var}(y_i) \\ &= \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 [\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2] 2\sigma^2 \\ &= \sigma^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{Eq.8}) \end{aligned}$$

Por otro lado,

$$\begin{aligned}\text{Var}(\beta^0) &= \text{Var}(y^- - \beta^1 x^-) = \\ &= \text{Var}(y^-) + \text{Var}(\beta^1 x^-) - 2\text{Cov}(y^-, \beta^1 x^-) \\ &= (\sigma^2/N) + (x^-)^2 \text{Var}(\beta^1) - 2x^- \text{Cov}(y^-, \beta^1)\end{aligned}$$

Pero tenemos que

$$\begin{aligned}\text{Cov}(y^-, \beta^1) &= \text{Cov}\left(\frac{1}{N} \sum y_i, \sum \frac{1}{N} x_i y_i\right) \\ &= \frac{1}{N} \sum \text{Cov}(y_i, y_i) \\ &= \frac{\sigma^2}{N} \sum 1 \\ &= 0\end{aligned}\tag{Eq.9}$$

Por lo tanto,

$$\text{Var}(\beta^0) = \sigma^2 \left[\frac{1}{N} + \frac{(x^-)^2}{\sum (x_i - x^-)^2} \right] \tag{Eq.10}$$

Adicionalmente, tenemos que

$$\text{Cov}(\beta^0, \beta^1) = -\sigma^2 x^- \frac{\sum (x_i - x^-)}{\sum (x_i - x^-)^2} \tag{Eq.11}$$

De las ecuaciones (Eq.8), (Eq.10) y (Eq.11), y utilizando el estimador $S_{y|x}$ de σ obtenido en la sección anterior, tenemos que, estimadores para los errores estándar de la pendiente (β_1) y ordenada al origen (β_0) y la covarianza entre ellos, vienen dadas por:

$$\begin{aligned}s_{\beta^1} &= \frac{S_{y|x}}{\sqrt{\sum (x_i - x^-)^2}} \\ s_{\beta^1} &= S_{y|x} \sqrt{\frac{\sum (x_i - x^-)^2}{N \sum (x_i - x^-)^2}}\end{aligned}$$

$$C\hat{\partial}V(\beta^0, \beta^1) = -S_y | x \frac{\bar{x}}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Los valores de $S\beta^1$ y $S\beta^0$ se pueden utilizar de la manera usual para obtener intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen. Así pues los límites de confianza de la pendiente vienen dados por $\beta^1 \pm t_{\alpha/2, n-2} S\beta^1$ donde el valor de $t_{\alpha/2, n-2}$ es el cuantil $1-\alpha/2$ de la distribución t con $n-2$ grados de libertad. Similarmente los límites de confianza para la ordenada al origen vienen dados por $\beta^0 \pm t_{\alpha/2, n-2} S\beta^0$.

1.5.3.2 Región de confianza conjunta para β_0 y β_1 .

En el ejemplo anterior, los intervalos de confianza para β_0 y β_1 los calculamos por separado. Estos especifican rangos para los parámetros individuales independientemente del valor del otro parámetro. Sin embargo, la Ecuación (Eq.11) muestra que la pendiente y la ordenada al origen estimadas, β^1 y β^0 , están relacionadas: si, otro conjunto de puntos de medición tomados de la misma población da lugar a un valor mayor para β^1 , es probable que esto conduzca a un valor más chico para β^0 . Los estimadores de pendiente y ordenada al origen no son variables aleatorias estadísticamente independientes y el valor de uno de los parámetros influye automáticamente en el del otro. Por lo tanto, a partir de los intervalos individuales de $100(1-\alpha)\%$, no podemos decir con el mismo grado de confianza que las hipótesis nulas $\beta_0=0$ y $\beta_1=1$ son simultáneamente aceptables. Esto es comparable con el problema de comparaciones múltiples discutido en ANOVA.

Si queremos testear la hipótesis conjunta de que $\beta_0=0$ y $\beta_1=1$, necesitamos usar una prueba de hipótesis compuesta o un intervalo de confianza conjunto (esto es, una región de confianza) para la pendiente y la ordenada al origen. Estas tienen en cuenta la correlación entre las estimaciones β^1 y β^0 .

La región de confianza conjunta toma la forma de una elipse con el centro (β^0, β^1) (los estimadores OLS de β_0 y β_1 respectivamente, y se define

como el conjunto de de todos los puntos (β_0, β_1) que verifican la siguiente desigualdad:

$$\frac{N(\beta_0 - \beta^0)^2 + \sum_{i=1}^N x_i(\beta_0 - \beta^0)(\beta_1 - \beta^1) + \sum_{i=1}^N x_i^2(\beta_1 - \beta^1)^2}{2S_{2y|x}} \leq F_{\alpha; 2, N-2} \quad (\text{Eq.12})$$

Donde $F_{\alpha; 2, N-2}$ es el cuantil $1-\alpha$ de la distribución F con 2 y $N-2$ grados de libertad.

Esta región es útil para establecer la precisión de un método de análisis en un rango de concentraciones y para comparar diferentes métodos analíticos y/o calibraciones.

Para analizar la precisión de un método analítico, el procedimiento es el siguiente. Una vez obtenido el modelo de calibración, se utiliza para estimar las concentraciones $\hat{x}_i$ correspondientes a los estándares de calibración x_i . Si el método es preciso, entonces la regresión de los valores $\hat{x}_i$ versus x_i debe ser una recta con pendiente 1 y ordenada al origen 0. La recta de regresión $\hat{x} = b^0 + b^1 x$ y su correspondiente $S_{\hat{x}x}$ son suficientes para obtener la región de confianza de nivel $1-\alpha$ para (b_0, b_1) (notar el cambio de notación en la pendiente y ordenada al origen, la cual obedece al hecho de que estamos considerando la regresión de los valores predichos $\hat{x}_i$ en x_i y no la regresión correspondiente a la calibración). Si el punto $(0,1)$ pertenece a esa región, se puede concluir que el método no tiene sesgo.

Por su parte, la representación conjunta de las regiones para varios métodos de calibración equipados con las mismas señales analíticas permite una comparación entre ellos; cuanto más pequeña sea la superficie de la región de confianza, más preciso será el método de calibración.

1.5.4 cálculo de una concentración y su error aleatorio

La aplicación más importante de una recta de calibración es la determinación de la concentración de un analito en una muestra problema.

Una vez que han sido determinadas la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de calibración, es fácil calcular la concentración (valor de X) correspondiente a cualquier señal medida en el instrumento (valor de Y). Es decir, el problema ahora es, para un valor especificado de Y, digamos y_{inc} , obtener un valor estimado, x_{inc} , de la concentración en la muestra incógnita, así como también un intervalo de confianza para dicho valor.

Para ello, comencemos notando que, como para el par de puntos (x_{inc}, y_{inc}) se verifica $y_{inc} = \beta_0 + \beta_1 x_{inc} + \epsilon_i$ (recta de calibración *poblacional*), podemos obtener la concentración estimada del analito en la muestra usando la recta estimada, es decir:

$$\hat{x}_{inc} = (y_{inc} - \hat{\beta}_0) / \hat{\beta}_1 \quad (\text{Eq.13})$$

Como vemos, el cálculo de una estimación para x_{inc} a partir de un valor dado y_{inc} involucra las estimaciones tanto de la pendiente ($\hat{\beta}_1$) como de la ordenada en el origen ($\hat{\beta}_0$) y, como se vio en la sección anterior, ambos valores están sujetos a error. Además, la señal del instrumento derivada del material de ensayo también está sujeta a errores aleatorios. Como resultado, la determinación de la incertidumbre global en la concentración correspondiente es extremadamente compleja. Una alternativa (ampliamente utilizada) es aproximarla propagando las incertidumbres. Para ello tenemos:

Cantidad de interés: x_{inc} que es función de β_0 , β_1 e y_{inc} a través de la función $f(x, y, z) = (x - y/z)$.

Estimador $\hat{x}_{inc} = (y_{inc} - \hat{\beta}_0) / \hat{\beta}_1$

El problema que tenemos aquí es que los estimadores involucrados no son independientes (como lo hemos pedido al obtener la expresión para la incertidumbre del nuevo estimador). Pero notemos que podemos escribir

$$\hat{x}_{inc} = \frac{y_{inc} - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1}$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{y_{inc} - \bar{y} + \beta^1 x^-}{\beta^1} \\
&= \frac{y_{inc} - \bar{y}}{\beta^1} + x^-
\end{aligned} \tag{Eq.14}$$

De esta última expresión, notemos que

$$\text{Cov}(y_{inc} - \bar{y}, \beta^1) = \text{Cov}(y_{inc}, \beta^1) - \text{Cov}(\bar{y}, \beta^1)$$

Como lo probamos en (Eq.9), el segundo término es 0, mientras que $\text{Cov}(y_{inc}, \beta^1)$ es cero pues, recordemos que $\beta^1 = \sum_{i=1}^N c_i y_i$ y por lo tanto, por el supuesto de independencia de las observaciones, y_{inc} resulta independiente de β^1 . Por el mismo motivo y_{inc} es también independiente de $\bar{y}$.

Si aplicamos entonces la regla que obtuvimos para propagar incertidumbres a la relación dada en la Ecuación (Eq.14), obtenemos la siguiente fórmula para el estimador del error estándar de x^0

$$Sx^{inc} = \frac{Sy|x}{\beta^1} \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{(y_{inc} - \bar{y})^2}{\beta^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \tag{Eq.15}$$

En algunos casos el analista puede realizar varias lecturas de la muestra problema para obtener el valor de y_{inc} . Si disponemos de m lecturas, entonces la ecuación para Sx^{inc} se convierte en:

$$Sx^{inc} = \frac{Sy|x}{\beta^1} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{(y_{inc} - \bar{y})^2}{\beta^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \tag{Eq.16}$$

Notar que la Ecuación (Eq.16) se reduce a la (Eq.15) cuando $m=1$ como es de esperar.

Por otro lado notemos que, si utilizamos la relación dada en la Ecuación (Eq.13), podemos reexpresar la Ecuación (Eq.16) de la siguiente manera:

$$Sx^{inc} = \frac{Sy|x}{\beta^1} \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{(x^{inc} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \tag{Eq.17}$$

Es importante destacar, como podemos observar de la Ecuación (Eq.17), que la incertidumbre en la predicción depende de cada muestra y no de la calibración en forma global, ya que para cada muestra incógnita hay un valor predicho de la concentración $\hat{x}_{inc}$ y por lo tanto un valor asociado del desvío estándar $S\hat{x}_{inc}$.

Una vez que hemos calculado *-estimado-* el error estándar de $\hat{x}_{inc}$, podemos construir un intervalo de confianza del $100(1-\alpha) \%$ para la verdadera concentración x_{inc} , a saber:

$$\hat{x}_{inc} \pm t_{\alpha/2, n-2} S\hat{x}_{inc} \quad (\text{Eq.18})$$

1.5.5 cálculo de las cifras de mérito.

Las cifras de mérito de un método analítico se utilizan regularmente con el propósito de calificar un determinado método y compararlo con otros que ya están publicados y con protocolos oficiales que determina la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Condensan las propiedades de conjuntos de datos en unos pocos indicadores numéricos.

Incluyen, entre otras, las siguientes:

Sensibilidad de calibración

Sensibilidad analítica

Límite de detección

Límite de cuantificación

Rango dinámico

Rango lineal

1.5.5.1 Sensibilidad de la calibración.

Es el cambio en la señal de respuesta por unidad de cambio en la concentración del analito.

$$SEN = \beta^1_1$$

La sensibilidad de la calibración es entonces la pendiente de la curva de calibración, y sus unidades son *señal* $\times$ *concentración*⁻¹.

1.5.5.2 Sensibilidad Analítica.

La sensibilidad de calibración no es adecuada para comparar dos métodos analíticos cuando estos están basados en respuestas de diferente naturaleza (por ejemplo, absorbancia y fluorescencia, o absorbancia y medidas electroquímicas, etc.). Para ello es preferible utilizar la llamada *sensibilidad analítica* γ , definida por el cociente entre la sensibilidad y el ruido instrumental:

$$\gamma = \frac{SEN}{S_y}$$

donde S_y es una medida conveniente del nivel de ruido en la respuesta. Para estimar el nivel de ruido pueden usarse dos procedimientos, que en teoría deberían coincidir. En el primero, se estima el ruido instrumental a través de los desvíos de las réplicas de las mediciones de calibrado respecto de sus promedios:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{N-k}} \quad (\text{Eq.19})$$

donde k es el número de niveles de concentración estudiados en la recta, r es el número de réplicas por cada nivel, y_{ij} es el valor de la respuesta correspondiente a cada nivel y réplica e $\bar{y}_i$ es el promedio de las respuestas de las réplicas para cada nivel de concentración. En la Ecuación (Eq.19), el número de grados de libertad es $N-k$, ya que de los N datos disponibles, k grados de libertad se reservan para el cálculo de las k medias $\bar{y}_i$.

En el segundo método de estimación del nivel de ruido, se lo estima como el desvío estándar de los residuos de la regresión lineal $S_{y|x}$ cuya fórmula de cálculo obtuvimos anteriormente (Eq.7).

Si los datos estudiados cumplen la relación lineal entre respuesta y concentración, los dos métodos anteriormente descritos deben proveer resultados similares en cuanto a la estimación del ruido instrumental.

1.5.5.3 Límites de detección

El límite de detección (LOD) se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada de manera confiable por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LOD sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente. Dicho de otro modo, es la mínima concentración de analito que es significativamente mayor que cero.

1.5.5.3.1 Falsos positivos y falsos negativos

El LOD se calcula mediante una prueba de hipótesis estadística. Vamos a imaginar un determinado método analítico y vamos a situarnos mentalmente en el eje de las concentraciones. Vamos a suponer también que el método analítico tiene una precisión conocida a lo largo de los diferentes niveles de concentración y que los resultados obtenidos con dicho método siguen una distribución normal. Si analizáramos blancos de muestra con el método, bien seguro obtendríamos una distribución de valores de concentración como la que muestra la Figura 19

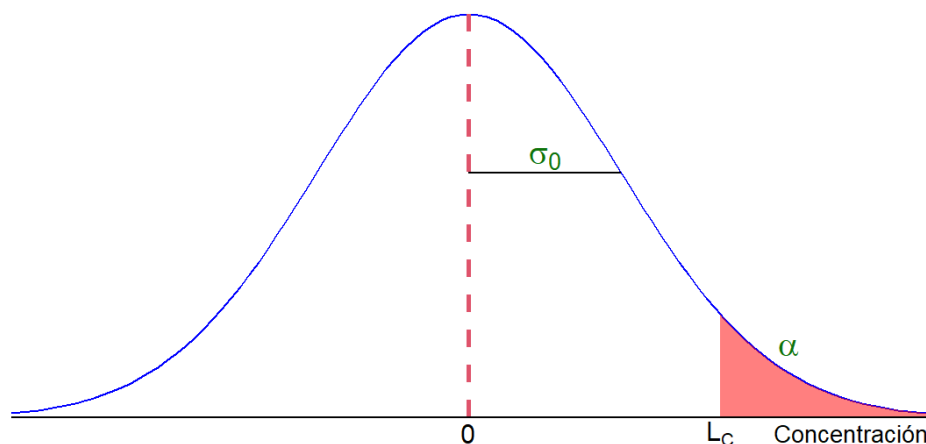


FIGURA 19. DISTRIBUCIÓN ALREDEDOR DE CERO Y NIVEL CRÍTICO

Los valores de concentración (en ausencia de un error sistemático) se distribuirían alrededor de cero con una desviación estándar σ_0 . Quiere decir que, como resultado de la medida de un blanco, y debido a los errores experimentales del método (reflejados en σ_0) podríamos obtener una concentración que no fuese cero. Como responsables de los resultados generados en el laboratorio, lo que nos gustaría es poder acotar la distribución en algún punto. Dicho punto es el valor crítico, L_C , que nos permitirá, una vez medida la muestra, tomar la decisión de si el analito se halla presente o no. Si la concentración obtenida es superior a L_C entonces resulta poco probable que corresponda al blanco y podemos decir que el analito está presente en la muestra. Existe, sin embargo, un riesgo al acotar la distribución en L_C (probabilidad de que el análisis de un blanco diese como resultado una concentración superior a L_C , con lo que falsamente concluiríamos que el analito está presente) Dicha probabilidad, α , como ya hemos estudiado, es error de tipo I o probabilidad de falso positivo.

Es decisión del laboratorio la elección del valor de α , en función al riesgo, que se está dispuesto a asumir, de equivocarnos. Podríamos establecer, por ejemplo, el valor crítico a concentración cero. El riesgo en ese caso de cometer un falso positivo sería del 50% (cualquier valor de concentración por encima de cero sería considerado como debido a la presencia de analito). Si α se toma igual a 0.05,

entonces una concentración superior a LC tendrá solo un 5% de probabilidades de constituir un falso positivo.

Ahora bien, ¿podemos adoptar el valor de LC de la Figura 19 como el límite de detección de nuestro método analítico? Supongamos que es así y que dicho valor corresponde a una concentración de 2 ppb. Es decir, el laboratorio está asumiendo que es capaz de detectar analitos en muestra a un nivel de concentración igual o superior a 2 ppb. Imaginemos que un cliente del laboratorio le suministra un lote de muestras con un contenido de 2 ppb de analito. El laboratorio analiza dichas muestras y obtiene una distribución de valores semejante a la mostrada en la Figura 20 (en rojo):

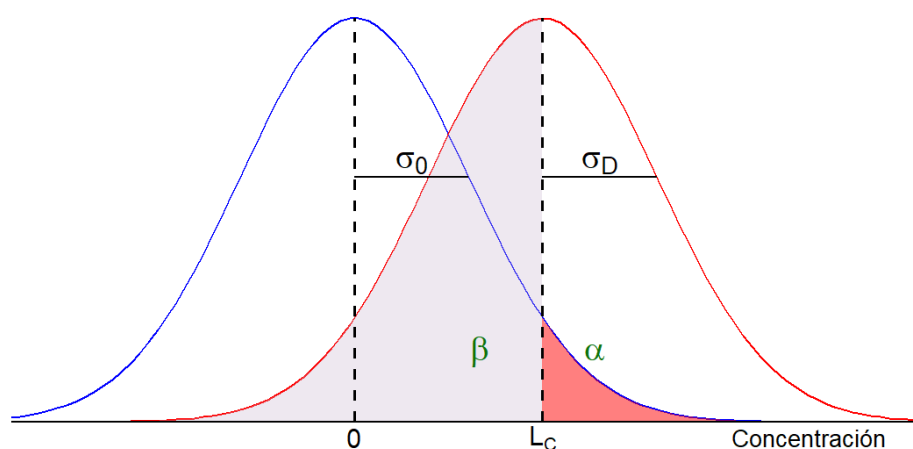


FIGURA 20. NIVEL CRÍTICO DE LÍMITE DE DETECCIÓN PARA UNA PROBABILIDAD A. EL RIESGO DE COMETER UN FALSO NEGATIVO ES DEL 50%

Las concentraciones se distribuirían aproximadamente alrededor de 2 ppb, mitad hacia arriba y mitad hacia abajo. ¿Cuál sería la consecuencia? Pues que aproximadamente en la mitad de los casos el laboratorio diría que no hay analito en la muestra, o que no puede detectarlo, puesto que las concentraciones caen por debajo del valor crítico, L_C . ¿Cómo es posible? El laboratorio había asegurado que es capaz de detectar a un nivel de 2 ppb y ahora, a este nivel de concentración, se equivoca la mitad de las veces. Existe pues un riesgo de concluir erróneamente que

el analito no está presente cuando en realidad si lo está. Como sabemos, dicha probabilidad, β , es el error de tipo II o probabilidad de falso negativo.

Es nuevamente decisión del laboratorio la elección del valor de β . ¿Podemos permitirnos un 50% de errores? En caso negativo, la única alternativa para reducir el riesgo de falsos negativos es aumentar el LOD, como en el ejemplo de la Figura 21.

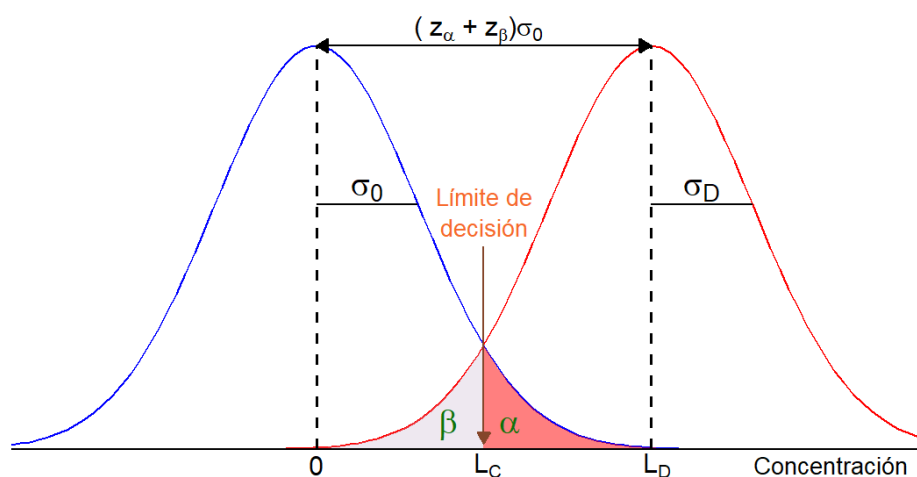


FIGURA 21. NIVEL CRÍTICO DE LÍMITE DE DETECCIÓN PARA $A=B$

Al aumentar el LOD el laboratorio se protege contra los falsos negativos. Imaginemos que ahora el LOD = 4 ppb. Claramente, si un cliente envía muestras conteniendo 4 ppb de analito, el laboratorio ahora corre un riesgo mucho menor de asegurar que el analito no está presente cuando en realidad sí lo está y a una concentración de 4 ppb.

1.5.5.3.2 Expresiones para el cálculo del valor crítico y del límite de detección

La decisión de si un determinado analito está presente o no en una muestra se basa en la comparación de la concentración predicha del analito con el nivel crítico, L_C , que se define como:

$$L_C = z_{\alpha} \sigma_0 \quad (\text{Eq.20})$$

donde z_{α} es el cuantil $1-\alpha$ de la distribución normal estándar y σ_0 es la desviación estándar de la concentración neta cuando el analito no está presente en la muestra

(i.e, de la distribución del blanco). LC se define para marcar un valor mínimo a partir del cual una concentración predicha se considera causada por el analito. De esta forma, existe un riesgo α de cometer un error de tipo I (o falso positivo). Sin embargo, si queremos mantener un riesgo (llamado β) pequeño de cometer un falso negativo, el LOD del método, LD, debe ser mayor. Así pues, tomando en consideración ambas probabilidades de error:

$$LD = z_{\alpha}\sigma_0 + z_{\beta}\sigma_D \quad (\text{Eq.21})$$

donde z_{β} es el cuantil $1-\beta$ de la distribución normal estándar y σ_D es la desviación estándar de la concentración neta cuando el analito está presente en la muestra al nivel del LDD. En las ecuaciones (Eq.20) y (Eq.21) se ha asumido que las concentraciones siguen una distribución normal con varianza conocida.

Como podemos notar, el valor del LOD depende de α y de β , y de los desvíos estándar σ_0 y σ_D de las dos distribuciones gaussianas de la Figura 22. En general ambas probabilidades se toman iguales a 0.05, mientras que los desvíos estándar se suponen iguales (hipótesis de varianza constante). De este modo, la ecuación (Eq.21) se transforma en:

$$LD = 2z_{\alpha}\sigma_0 \approx 3.3\sigma_0 \quad (\text{Eq.22})$$

Si no se conoce la varianza, debe estimarse a partir de análisis replicados. De la misma forma, los valores de z , basados en distribuciones normales deben ser reemplazados por los correspondientes valores t de una distribución t con $v=N-2$ grados de libertad. Así, (tomando $\alpha=\beta$) las expresiones para LC y LD (asumiendo varianza constante) son:

$$LC = t_{\alpha,vs0} \quad (\text{Eq.23})$$

$$LD = 2t_{\alpha,vs0} \quad (\text{Eq.24})$$

Como se puede observar, las ecuaciones para el cálculo de LC y LD son bastante simples. La dificultad mayor proviene de la estimación de s_0 . En la definición

moderna, el LOD se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco, lo que significa que para obtener la estimación s_0 , utilizamos la fórmula de la Ecuación (Eq. 17).

Si su ponemos que se analiza una muestra por triplicado (lo más usual es $m=3$) en la que el analito no está presente ($x_0=0$), la Ecuación (Eq.17) se reduce a:

$$S_0 = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Eq.25})$$

1.5.5.4 Límite de cuantificación

Es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro (LOQ) se toma como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar (en unidades de concentración) del blanco, con lo cual:

$$\text{LOQ} = 10s_0$$

De este modo, coeficiente de variación (CV) para una concentración media igual al LOQ es del 10%, nivel que se toma convencionalmente como el máximo RSD aceptable para cuantificar el analito en una muestra.

Las relaciones entre los tres niveles y su significado en el análisis se muestran en la Figura 22.

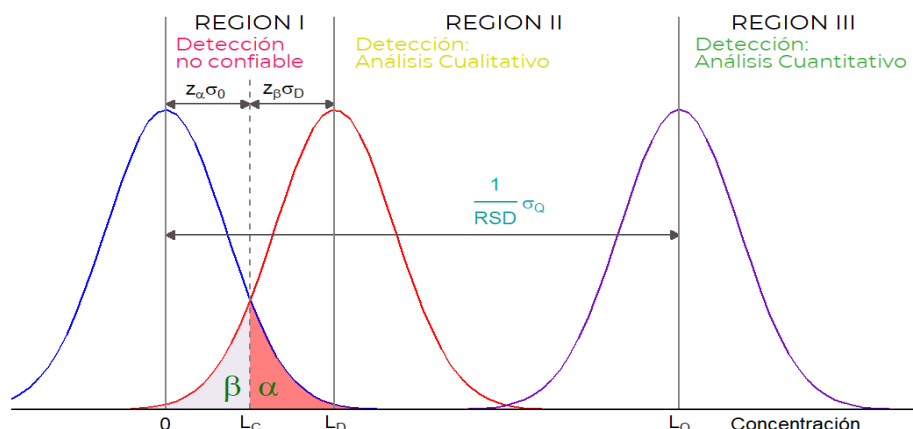


FIGURA 22. REPRESENTACIÓN GRAFICA DE LAS DECISIONES TOMADAS EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN (CURRIE 1968).

1.5.5.5 Rango dinámico

Se considera que va desde la menor concentración detectable (el LOD) hasta la pérdida de relación entre respuesta y concentración. El rango dinámico es también el rango de aplicabilidad de la técnica. En la zona de pérdida de la linealidad, podría aplicarse, en principio, un método de regresión polinómica para la calibración (o algún otro de naturaleza no lineal), de modo que nada impide que dicha zona sea utilizada con propósitos predictivos.

1.5.5.6 Rango lineal

Se considera que el rango lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (el LOQ) hasta la pérdida de la linealidad (ver Figura 23). Una manera conveniente de medir el cumplimiento de la linealidad es a través de la relación que existe entre la varianza de la regresión, medida por $S^2_{y|x}$ (ver Eq.7), y la del ruido instrumental, medida por S^2_y (ver Eq.19). Si la primera es significativamente mayor que la segunda, se supone que hay causas de desvío del modelo lineal que son estadísticamente superiores al ruido en la respuesta. Para emplear esta prueba es esencial que se cumpla el supuesto bajo el cual se realiza el ajuste lineal, esto es, que los errores en concentración de calibrado sean menores que en respuesta. De lo contrario, se acumularían en $S^2_{y|x}$ incertidumbres derivadas de la imprecisión en las concentraciones de los patrones, que nada tienen que ver con el ruido instrumental o la falta de linealidad. La prueba estadística para determinar si los datos se ajustan al modelo lineal utiliza el estadístico F, cuyo valor observado, F_{obs} , viene dado por:

$$F_{obs} = \frac{S^2_{y|x}}{S^2_y}$$

Este valor se compara con el cuantil $1-\alpha$ de la distribución $F_{N-2, N-k}$ (F con $N-2-2$ y $N-k$ grados de libertad).

Si $F_{obs} < f_{\alpha; N-2, N-k}$ se rechaza la hipótesis de que los datos se comportan de manera lineal.

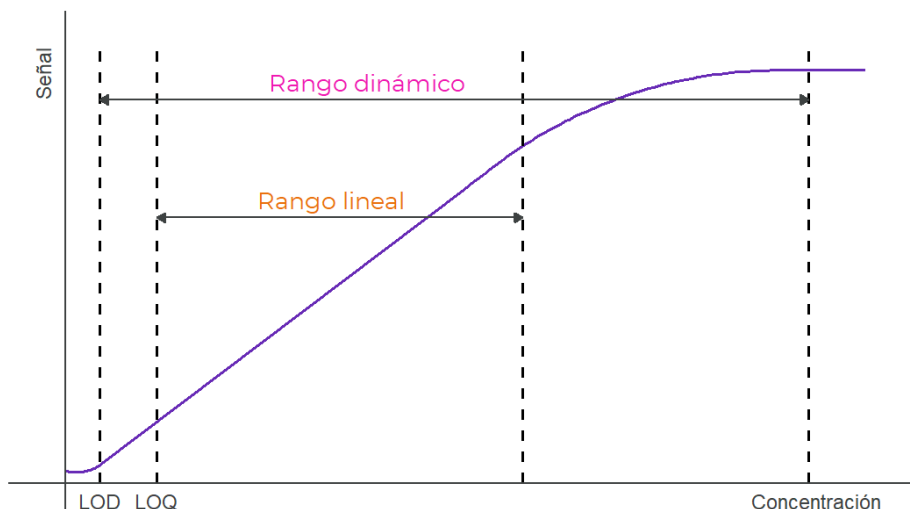


FIGURA 23. RANGO DINÁMICO Y LINEAL DE UN MÉTODO ANALÍTICO.

1.5.6 Método de las adiciones de estándar

La preparación de estándares que reproduzcan la composición de la muestra es muy complicada cuando se trata del análisis de muestras complejas (suelos, minerales, sangre completa, orina, etc.) ya que, en este tipo de muestras, usualmente, los componentes de la matriz afectan las medidas de la señal analítica ya sea por exceso o por defecto.

Con el objetivo de minimizar los efectos de la matriz, se utiliza el método de adición de estándar en el que la muestra se utiliza como una especie de “blanco” al que se añade más analito. Para ello, se añaden cantidades conocidas y crecientes del analito a alícuotas de la muestra desconocida y todas se diluyen al mismo volumen final. Posteriormente, se procede a determinar la señal de todas estas soluciones (las muestras enriquecidas y la desconocida) y se representa gráficamente la señal analítica en función de la concentración del estándar añadido.

Este método no elimina las interferencias, solo las compensa ya que se obtienen todas las señales analíticas bajo las mismas condiciones.

La Figura 24 muestra un fuerte efecto de matriz en el análisis de perclorato (ClO_4^-) por espectrometría de masas. Se tiene que controlar el perclorato en agua potable

porque por encima de 18 $\mu\text{g/L}$ puede reducir la producción de hormonas tiroideas. Disoluciones patrón de ClO_4^- en agua pura (calidad reactiva) origina la curva de calibrado superior que aparece en la Figura 24. La respuesta a disoluciones patrón con la misma concentración de ClO_4^- en agua subterránea es 15 veces menor, como se ve en la curva inferior. La disminución de la señal del ClO_4^- es el *efecto de matriz* atribuido a otros aniones presentes en el agua subterránea.

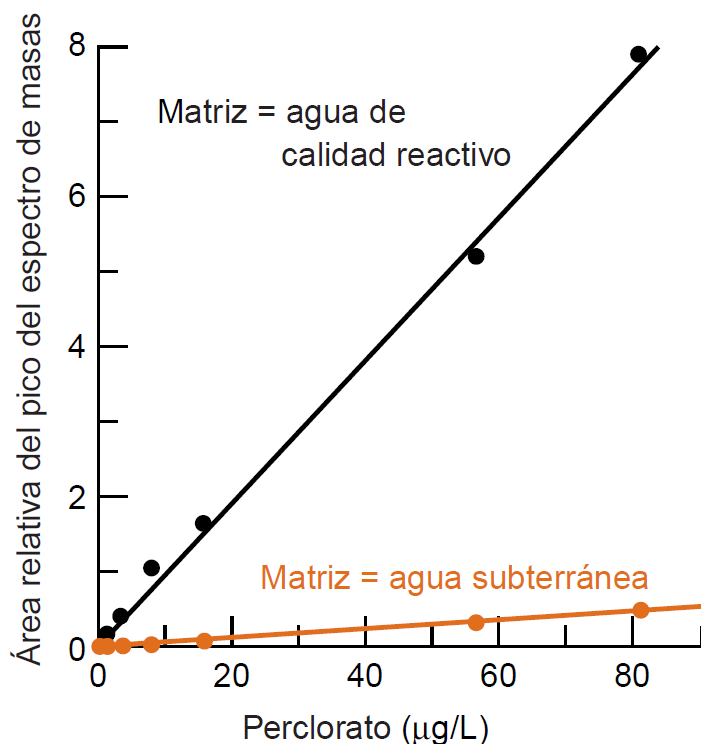


FIGURA 24. CURVAS DE CALIBRADO DEL PERCLORATO EN AGUA PURA Y EN AGUA SUBTERRÁNEA (HARRIS 2016).

Dado que diferentes aguas subterráneas tienen diferentes concentraciones de muchos aniones, no es posible construir una curva de calibrado para este análisis que pueda aplicarse a más de una determinada agua subterránea. Y de ahí que se requiera el método de la adición de estándar. Si se añade un pequeño volumen de una disolución concentrada de patrón al problema desconocido, no se modifica mucho la concentración de la matriz. El supuesto que se hace en el método de adición de estándar es que la influencia de la matriz es la misma en el analito añadido que en el analito original de la muestra problema.

En la Figura 25 se ilustra una manera de llevar a cabo el método de adición de estándar. Se pipetea en cada matraz volumétrico volúmenes iguales de la muestra problema. A continuación, se añaden volúmenes crecientes de estándar a cada matraz. Finalmente, se diluye cada matraz hasta el enrase. Cada matraz contiene, pues, la misma concentración de muestra problema y diferentes concentraciones de estándar.

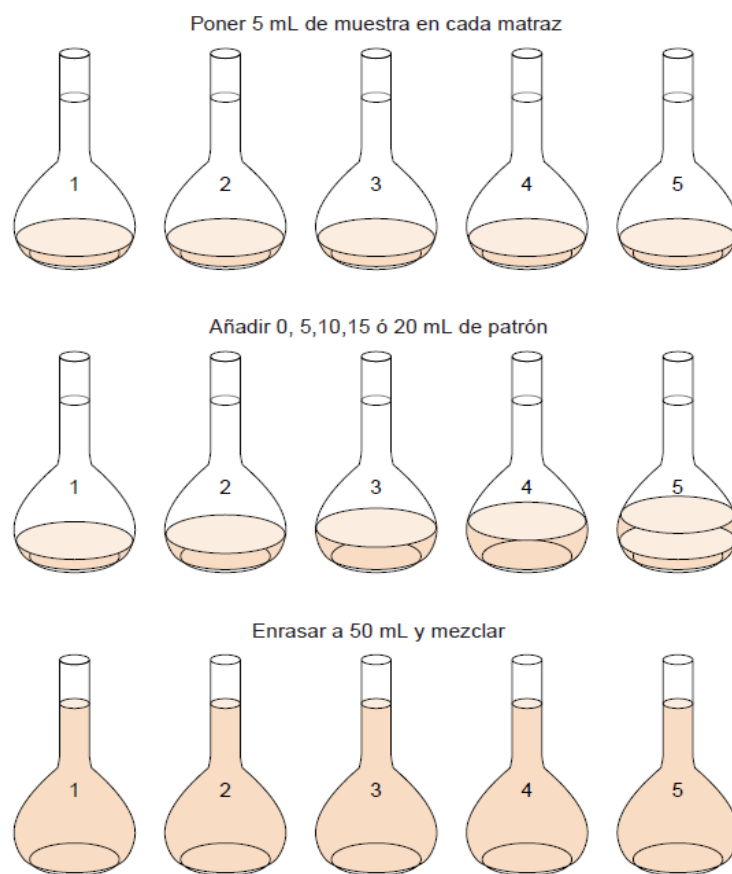


FIGURA 25. ANÁLISIS APLICANDO EL MÉTODO DE ADICIONES DE ESTÁNDAR. INICIALMENTE EN CADA MATRAZ AÑADE EL MISMO VOLUMEN DE MUESTRA (5mL). SE ADICIONAN 0, 5, 10, 15, 20 mL DE ESTÁNDAR. SE AFORA A VOLUMEN FINAL (POR EJEMPLO 50 mL).

1.5.6.1 Procedimiento

El procedimiento experimental para un análisis de adiciones de estándar es el siguiente. Se añaden volúmenes iguales, V_x , de una solución de analito de concentración desconocida, c_x , a una serie de matraces volumétricos de

volumen V_t . Se utiliza una solución estándar de analito de concentración c_s para enriquecer los matraces utilizando un volumen diferente, V_s , en cada caso. Normalmente, se utilizan incrementos regulares de V_s . A continuación, se añaden los reactivos adecuados y finalmente, cada matraz aforado se llena hasta el enrase con el disolvente apropiado. De esta manera, la concentración del analito en cada uno de los matraces aforados es

$$\text{Conalito} = \frac{c_s V_s}{V_t} + \frac{c_x V_x}{V_t}$$

Usando el método de adiciones de estándar, dentro del rango de calibración lineal, se supone que la señal de respuesta, R , del instrumento de análisis es directamente proporcional a la concentración de analito; es decir

$$R = k \left(\frac{c_s V_s}{V_t} + \frac{c_x V_x}{V_t} \right) = k \left[\frac{V_x}{V_t} \left(\frac{c_s V_s}{V_x} \right) + \frac{c_x V_x}{V_t} \right] \quad (\text{Eq.26})$$

Definiendo c' como el aumento en la concentración de analito en el volumen de muestra original (V_x) debido a los estándares añadidos, tenemos que

$$c' = \frac{c_s V_s}{V_x}$$

Por consiguiente, la Ecuación (26) puede escribirse en forma lineal

$$R = mc' + b$$

con pendiente

$$m = k \frac{V_x}{V_t} \quad (\text{Eq.27})$$

y ordenada al origen

$$b = k \frac{c_x V_x}{V_t} \quad (\text{Eq.28})$$

La abscisa al origen, o intercepto con eje x , c'_0 , ocurre cuando $R=0$ y $b = -mc'_0$, de donde podemos escribir $c'_0 = -b/m$.

Sustituyendo la pendiente y la ordenada al origen con las Ecuaciones (Eq.28) y (Eq.29) respectivamente, tenemos que la concentración en la muestra incógnita, c_x , es

$$c_x = -c'_0 = \frac{b}{m} \quad (\text{Eq.29})$$

Por lo tanto, usando esta relación, la concentración de analito en la muestra problema se puede obtener a partir de la regresión de R en c' (i.e. la señal de instrumento en función de las cantidades de estándar añadidas) por extrapolación el punto de corte con el eje c' . Veamos ahora cuál es la precisión de c_x , expresada por el error estándar Sc_x .

En el siguiente desarrollo, las coordenadas (c', R) se reemplazarán por las más convencionales (x, y) y consideremos que tenemos N puntos (x_i, y_i) en el gráfico de calibración de adición de estándar.

Como vimos en la sección precedente, $c_x = f(b, m) = b/m$. Dado que m y b están sujetos a error, el valor calculado también lo estará. Entonces, para estimar el error de esta estimación, podemos propagar errores, pero deberemos considerar que m y b no son independientes (recordar que en la deducción que hicimos de propagación de errores en expresiones multiplicativas, un supuesto importante que consideramos fue que los estimadores eran estadísticamente independientes) (En realidad nos alcanza con que sean *no correlacionados*).

En este caso podemos considerar que c_x es función de la ordenada al origen y de la pendiente a través de la función $f(x, y) = xy$. Luego:

$$\frac{\partial f}{\partial x} = \frac{1}{y}$$

$$\frac{\partial f}{\partial y} = \frac{-x}{y^2}$$

Luego el desarrollo en Taylor de primer orden de la f resulta

$$cx \approx \frac{b}{m} + \frac{1}{m}(b - \alpha) - \frac{b}{m^2}(m - \beta) \quad (\text{Eq.30})$$

Calculado la varianza en ambos miembros tenemos

$$\begin{aligned} \text{Var}(cx) &\approx \frac{1}{m^2} \text{Var}(b) + \frac{b^2}{m^4} \text{Var}(m) + 2\text{Cov}\left(\frac{1}{m}b, -\frac{b}{m^2}m\right) \\ &= \frac{1}{m^2} \frac{S^2_{y|x} \sum ix^2}{N \sum i(xi - \bar{x})^2} + \frac{b^2}{m^4} \frac{S^2_{y|x}}{\sum i(xi - \bar{x})^2} + 2 \frac{b}{m^3} \frac{S^2_{y|x}}{\bar{x} \sum i(xi - \bar{x})^2} \\ &= \left(\frac{S^2_{y|x}}{m^2} \frac{\sum ix^2}{N \sum i(xi - \bar{x})^2} + \frac{b^2}{m^2} \frac{1}{\sum i(xi - \bar{x})^2} + 2 \frac{b}{m} \frac{\bar{x}}{\sum i(xi - \bar{x})^2} \right) \\ &= \frac{S^2_{y|x}}{m^2} \left(\frac{m^2 \sum ix^2 + Nb^2 + 2Nmb\bar{x}}{Nm^2 \sum i(xi - \bar{x})^2} \right) \\ &= \frac{S^2_{y|x}}{m^2} \frac{1}{N} + \frac{(m\bar{x} + b)^2}{m^2 \sum i(xi - \bar{x})^2} \\ &= \frac{S^2_{y|x}}{m^2} \left(\frac{1}{N} + \frac{\bar{y}^2}{\sum i(xi - \bar{x})^2} \right) \end{aligned}$$

De esta manera, la fórmula para el error estándar de la concentración en la muestra problema resulta:

$$Scx = \frac{S_{y|x}}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{y}^2}{m^2 \sum i(xi - \bar{x})^2}} \quad (\text{Eq.31})$$

Notar que esta expresión no es igual a la que obtuvimos antes cuando calculamos la predicción de una concentración a partir del modelo de calibración (Eq.16). Esto se debe a que, en este caso, la cantidad no se predice a partir de un valor medido de y , sino que extrapolamos la curva de calibración al corte con el eje x y por lo tanto el valor de y para la incógnita es 0 y el término $1/m$ está ausente.

1.5.7 exactitud y comparación de dos métodos analíticos.

En esta sección vamos a ver una aplicación de la regresión lineal al análisis de la exactitud de un método analítico y para la comparación de dos métodos analíticos diferentes.

Para el estudio de la exactitud de un método analítico, es usual preparar una serie de patrones con concentraciones conocidas del analito, diferentes a las utilizadas en la etapa de calibración. Luego se determina la concentración del analito en cada uno de ellos por interpolación en la recta de calibrado, y se analiza la exactitud de la determinación a través de la recuperación de las concentraciones nominales del analito.

Por otro lado, cuando se desean comparar dos métodos analíticos, se determina, por ambos métodos, el contenido de un analito en una serie de muestras en las que su concentración es variable (dentro del rango lineal de cada uno de ellos).

En ambos casos se trata de comparar pares de valores que idealmente serían iguales, y estudiar el posible desvío de esta situación ideal, en un contexto estadístico y con un cierto nivel de confianza.

1.5.7.1 Exactitud de un método analítico.

Si se dispone de una serie de patrones de concentración conocida para la validación de un método analítico, se procede del modo siguiente. En primer lugar, se miden sus respuestas, incluyendo réplicas de cada medición (usualmente cada patrón se mide por triplicado). Se estima la concentración a partir de cada respuesta analítica, se promedian los valores para cada nivel y se calcula el desvío estándar asociado.

Luego se realiza una regresión lineal de los promedios en función de las concentraciones nominales de cada nivel.

Una aclaración sobre notación: En lo que resta de la sección, vamos a llamar:

X a la concentración nominal de cada nivel,

Y a la concentración promedio predicha para las réplicas de cada nivel,

r es el número de réplicas en cada patrón,

q el número de niveles de validación estudiados (i.e. la cantidad de patrones utilizados en el estudio de validación),

s_{yi} el desvío estándar en la señal para cada nivel de concentración (x_i), por lo tanto, tenemos q desvíos estándar, y los mismos están dados por:

$$s_{yi} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{r - 1}}$$

donde y_{ij} es la concentración predicha para el patrón i en la réplica j e $\bar{y}_i$ es el promedio de las r réplicas para el nivel i.

Una observación importante que debemos hacer es que para realizar un estudio por regresión lineal simple un supuesto importante es que la varianza de la variable Y|X es constante (*homocedasticidad*).

En la calibración de datos analíticos se supone que la distribución del ruido instrumental es constante a lo largo del rango de calibración, o, en otras palabras, que la respuesta analítica es homocedástica. Esto no es necesariamente cierto, sin embargo, cuando la variable Y es la concentración predicha para patrones de validación, y no la respuesta analítica.

Como lo hemos estudiado, el desvío estándar en la concentración predicha mediante una recta de calibrado no es constante para diferentes muestras, sino que varía con la concentración del analito. Es decir que, en principio, la variable Y que

estamos considerando ahora no es homocedástica. En estos casos, se recomienda realizar una regresión lineal mediante cuadrados mínimos ponderados (WLS, por weighted least squares) y no una regresión ordinaria (OLS). Por supuesto que primero debemos verificar si la varianza puede considerarse o no constante para luego decidir que regresión debemos ajustar a los datos.

En las unidades de Intervalo de confianza y Test de hipótesis bajo normalidad, ya hemos estudiado cómo decidir si dos varianzas pueden considerarse iguales o no. La idea aquí es utilizar ese mismo test, pero considerando la máxima y la mínima varianza muestral. De este modo, el estadístico F a utilizar será

$$F = \frac{\max(s^2 y_i)}{\min(s^2 y_i)}$$

que, bajo la hipótesis nula de igualdad de varianzas poblacionales, tiene distribución aproximadamente $F_{r-1, r-1}$ (a diferencia del estadístico que utilizamos para comparar dos varianzas, aquí tenemos el cociente entre dos de los que se denominan “estadísticos de orden”, y por este motivo la distribución no es exactamente una F). El valor del estadístico calculado con la muestra se compara con el cuantil $1-\alpha$ de la distribución correspondiente. Si $F_{obs} > f_{1-\alpha; r-1, r-1}$ entonces rechazamos la hipótesis nula y en tal caso lo recomendable es utilizar WLS para estimar el modelo de regresión.

Un estudio detallado de cómo se obtienen las estimaciones de los parámetros β_0 y β_1 utilizando WLS se escapa del alcance de este curso, pero nos parece importante (¡e interesante!) mencionarlo para futuras referencias.

1.5.7.1.1 Región de confianza cuando las varianzas son constantes.

Consideremos primero el caso en que el test de igualdad de varianza no conduce a rechazar la hipótesis nula y, por lo tanto, pudimos obtener los estimadores de β_0 y β_1 vía OLS.

Pensemos... En el caso ideal, el valor de concentración estimado debería estar muy cerca del verdadero valor (*valor nominal*) del estándar de validación. Si esto fuera cierto.

Tiene sentido pensar que, en tal caso, los puntos en dicho gráfico deberían estar prácticamente sobre la recta identidad, Bueno, eso es justamente lo que tenemos que chequear. Es decir, debemos considerar el **intervalo de confianza conjunto** para la pendiente y la ordenada al origen. Ya vimos que dicho intervalo conjunto es una región en el plano de las dos variables (pendiente y ordenada al origen) que tiene forma elíptica. Por este motivo, la prueba estadística correcta consiste en investigar si el punto (1,0) está contenido en la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada al origen.

1.5.7.1.2 Regresión ponderada

Si los datos no cumplen con la prueba de varianza constante, el análisis de los datos de validación debe hacerse mediante regresión lineal ponderada. Como ya lo hemos dicho, no vamos a hacer un estudio en profundidad de este caso, pero veamos cómo cambian las estimaciones cuando usamos regresión con pesos.

En este caso, las estimaciones de la pendiente y la ordena al origen se calculan minimizando la siguiente suma ponderada de cuadrados

$$SSEw = \sum_{i=1}^q w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{Eq.32})$$

donde w_i son los pesos o ponderaciones aplicado a cada punto de la regresión, q es la cantidad total de puntos (los niveles de validación), y_i es el valor de la variable Y en cada punto (i.e promedio $\bar{y}_i$ de las r réplicas del nivel i) e $\hat{y}_i$ es el valor ajustado por la recta.

En la regresión de mínimos cuadrados ponderados, el problema de la heterocedasticidad se mitiga introduciendo factores de ponderación inversamente proporcionales a la varianza:

$$w_i = \frac{1}{s^2 y_i}$$

El efecto concreto del pesado de los datos en forma inversamente proporcional a su variancia es dar mayor contribución, en la regresión, a los datos más precisos, y comparativamente menor peso a los menos precisos. Esto significa que queremos que la recta calculada pase más cerca de estos puntos más precisos que de los puntos menos precisos. La pendiente y la ordenada al origen vienen dadas por:

$$\beta^1 = \frac{\sum_{i=1}^q w_i (x_i - \bar{x}_w)(y_i - \bar{y}_w)}{\sum_{i=1}^q w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}$$

$$\beta^0 = \bar{y}_w - \beta^1 \bar{x}_w$$

onde x_i es la concentración (nominal) de cada uno de los q patrones de validación, y $\bar{x}_w = \frac{\sum w_i x_i}{\sum w_i}$ y $\bar{y}_w = \frac{\sum w_i y_i}{\sum w_i}$.

En el método WLS $sy|x$ (desvío estándar de los residuos de la regresión) está dado por:

$$sy|x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^q w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{q - 2}}$$

donde y_i es la respuesta experimental e $\hat{y}_i$ es la respuesta estimada en cada punto.

CAPITULO 2. DESARROLLO DEL TRABAJO

2.1 PROCEDIMIENTO

2.1.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA

Para preparar la solución concentrada, se puede optar por cualquiera de los siguientes procedimientos:

- a) Preparar las soluciones concentraciones de los componentes en forma individual. Determinar la masa ó medir la cantidad requerida de cada componente en diferentes matraces volumétricos y aforar (se puede utilizar como referencia la Tabla 2).
- b) Preparar una solución concentrada en conjunto, la cual contenga todos los componentes a analizar. Determinar la masa o medir la cantidad requerida de cada componente en un solo matraz y aforar (se puede utilizar como referencia la Tabla 2).
- c) se puede preparar la solución patrón en varios matraces de manera que tenga todos los componentes a cuantificar.

La(s) solución(es) concentrada(s) debe(n) prepararse con las cantidades necesarias para cubrir el intervalo de trabajo del laboratorio.

TABLA 2: CONCENTRACIONES RECOMENDADAS PARA LA PREPARACIÓN DE LA(S) SOLUCIÓN(ES) CONCENTRADA(S).

No.	Componentes	Concentraciones en g/100ml de solución de Etanol al 40 % v/v
1	Metanol	1.198
2	Sec-butanol	0.20
3	n-propanol	0.60
4	Iso-butanol	0.60
5	n-butanol	0.20
6	Iso-amílico	0.60

7	n-amílico	0.60
---	-----------	------

Se recomienda al pesar, iniciar por el componente menos volátil y terminar con el más volátil.

Si las soluciones se van a utilizar posterior mente, es recomendable almacenarlas en refrigeración a una temperatura máxima de 8°C

2.1.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ACETALDEHÍDO

En un matraz volumétrico de tipo A de 100 ml adicionar aproximadamente de etanol al 40 % v/v, taparlo y determinar su masa, anotar el valor de la masa.

La adición de la cantidad necesaria de acetaldehído se puede realizar por alguna de las siguientes maneras:

- a) medir con una jeringa de preferencia gastype;
- b) medir con una pipeta o micropipeta previamente refrigerada;0
- c)transferir el contenido de un vial o ampolleta sellada

nota: en todos los casos el material debe utilizarse a una temperatura máxima de 8°C.

Tapar el matraz y determinar su masa nuevamente, anotar el valor de la masa, agregar solución de etanol al 40 % v/v cercano a la línea de aforo. Mantener el matraz volumétrico en ambiente controlado (por lo menos durante 30 min), llevar al aforo y homogeneizar. Si la solución se va a utilizar posteriormente se almacena en refrigeración a una temperatura máxima de 8°C.

NOTA: Todos los reactivos deberán almacenarse de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

2.1.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO

En este caso se ejemplifica la preparación del 2-pentanol.

En un matraz volumétrico de 100 ml adicionar aproximadamente 50 ml de etanol al 40 % v/v, tapar el matraz y determinar la masa, adicionar la cantidad requerida de estándar interno, tapar y determinar la masa nuevamente, agregar solución de etanol al 40 % v/v cercano a la línea de aforo y homogeneizar. Colocar el matraz volumétrico en un ambiente controlado hasta llevarlo a 20 °C ± 5, aforar y homogeneizar.

La concentración de las soluciones se calcula de la siguiente manera:

Concentración del analito en

$$\text{g/100 ml} = \text{pp1} - \text{p2}$$

En donde:

P1 = masa del matraz con etanol al 40 % v/v y estándar interno.

P2 = masa del matraz con el etanol al 40 % v/v.

2.1.4 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE CALIBRACIÓN

Para preparar las soluciones de calibración transferir a matraces volumétricos de 100 ml las cantidades necesarias de la solución concentrada a temperatura controlada del laboratorio para obtener las concentraciones en mg/100 mL. Recomendadas en la Tabla2, adicionar el volumen requerido de solución estándar interno. Posteriormente llevar al volumen con la solución estándar interno. Posteriormente llevar al volumen con la solución de etanol.

Estas soluciones deben guardarse bien tapadas en refrigeración, a una temperatura máxima de 8°C.

TABLA 3: CONCENTRACIÓN DE LA(S) SOLUCIÓN(ES) DE CALIBRACIÓN

Solución concentrada (mL).	metanol	s-Butanol	n-Pro-panol	Iso-butanol	n-butanol	Iso-Amilico	Amilico activo	n-Amilico
0.25	11.982006	2.988012	6.03396	6.075824	2.058	11.96786	607.5824	3.05863

0.5	23.964012	5.976024	12.06792	12.151648	4.116	23.93572	607.5824	6.11726
1	47.928024	11.952048	24.13584	24.303296	8.232	47.87144	607.5824	12.23452
2	95.856048	23.904096	48.27168	48.606592	16.464	95.74288	607.5824	24.46904
3	143.784072	35.856144	72.40752	72.909888	24.696	143.61432	607.5824	36.70356

La concentración de la(s) solución(es) de calibración dependen de la concentración que se espera determinar en la muestra por analizar y el intervalo de trabajo de cada uno de los laboratorios.

2.2 CONDICIONES DE OPERACIÓN

Las condiciones de operación (flujos, rampas de temperatura del horno, temperatura del inyector, detector, volumen de inyección, entre otros) varían de acuerdo a la columna e instrumentos utilizados y deben ser optimizados por cada laboratorio, los cuales son determinados por medio del material de referencia certificado o con la(s) solución(es) patrón(es).

Los parámetros deberán ser ajustados para obtener la resolución cromatográfica > 1 de cada uno de los componentes a cuantificar mediante el software del equipo o alguna de las siguientes ecuaciones:

$$R = \frac{2(TR(b) - TR(a))}{WB(b) + WB(a)}$$

$$R = \frac{(\frac{2.35}{2})(TR(b) - TR(a))}{W50(b) + W50(a)}$$

En donde:

R = Resolución

TR(a) = Tiempo de retención del pico del componente a evaluar.

TR(b) =Tiempo de retención del pico próximo al componente a evaluar.

WB(a), WB(b) =Ancho de los picos a la base del componente a evaluar y el próximo a este.

W50(a), W50(b) = Ancho del pico medido al 50% de su altura.

2.2.1 CÁLCULOS Y RESULTADOS

Los resultados se deben expresar en mg Los aldehídos, esterés, alcoholes superiores y metanol referidos a 100 mL. De alcohol anhidro (mg/100 mL AA) utilizando al menos una cifra decimal. En caso de ser necesario se puede expresar en otras unidades realizando la conversión correspondiente.

Los alcoholes iso-amílico y amílico activo pueden expresarse por separado o como la suma de éstos.

2.2.2 CÁLCULO DE RELACIÓN DE CONCENTRACIONES Y DE ÁREAS

En la curva de calibración y de la muestra.

Cuando el equipo cuenta con software, este realiza los cálculos en forma automática, basándose en el modelo matemático de regresión lineal:

$$Y = mx + b$$

En donde:

Y = Relación de área del compuesto a cuantificar entre el área del estándar interno
 $\left(\frac{A_c}{A_{ei}}\right)$

X = Relación de la concentración del analito entre la concentración del estándar interno en mg/100 mL. $\left(\frac{A_c}{A_{ei}}\right)$

m = pendiente (Factor de respuesta relativo).

b = intercambio en el origen de la ordenada “y”.

sustituyendo variables

$$\frac{Ac}{Aei} = m\left(\frac{Cc}{Cei}\right) + b$$

Despejando para obtener la concentración del compuesto Cc en mg/100 mL:

$$\frac{Ac}{Aei} = m\left(\frac{Ac}{Aei}\right) + b$$

Considerando el Factor de dilución y el contenido alcohólico de la muestra, la concentración del compuesto expresado en mg/100 mL A.A. se obtiene con la siguiente fórmula.

$$\frac{Ac}{Aei} = m\left(\frac{Ac}{Aei}\right) + b$$

En donde:

FD: Factor de dilución en la preparación de la muestra con el estándar interno. = (Volumen total del matraz volumétrico/ Volumen de muestra empleada en la preparación).

% Alc. Vol. = Contenido alcohólico de la muestra en % alcohol en volumen a 20°C.

NOTA: en caso de realizar réplicas de cada uno de los niveles de la curva, se puede promediar las áreas para calcular los factores de respuesta.

La curva de calibración se considera válida si el coeficiente de correlación R^2 es mayor o igual a 0.99. los cálculos anteriores pueden hacerse utilizando altura de pico en lugar de áreas.

2.3 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

2.3.1 REPETIBILIDAD

a) La repetibilidad de los resultados de las mediciones con este método.

Para valores de hasta 10 mg/100 mL A.A. no debe exceder de 12 % C.V.

Para valores mayores de 10 hasta 250 mg/100 mL. A.A. no debe exceder de 5% C.V.

Para valores mayores a 250 mg/100 mL., no debe exceder de 3% C.V.

2.3.2 REPRODUCIBILIDAD

b) la reproducibilidad de los resultados de las mediciones con este método.

Para valores de hasta 10 mg/100 mL A.A. no debe exceder de 25 % C.V.

Para valores mayores de 10 hasta 250 mg/100 mL. A.A. no debe exceder de 15% C.V.

Para valores mayores a 250 mg/100 mL., no debe exceder de 7% C.V.

En el presente trabajo de investigación, se tuvo como objetivo principal el validar un método analítico, para la determinación y cuantificación de metanol y alcoholes superiores ocupados en el desarrollo de este, y los cuales están presentes dentro de la composición de las bebidas alcohólicas por lo que todos los parámetros analizados fueron satisfactorios.

TABLA 4: CONDICIONES DE TRABAJO DEL CROMATÓGRAFO DE GASES

Temperatura del inyector	200°C
Temperatura del detector	250°C
Temperatura del horno	40°C por 8 min., incrementando a 80°C a una razón de 5 min. Manteniéndose en 80°C por 1 min. Incrementando a 150°C a una razón de 8 min., Manteniéndose en 150°C por 2 min Incrementando a 200°C a una razón de 2 min.

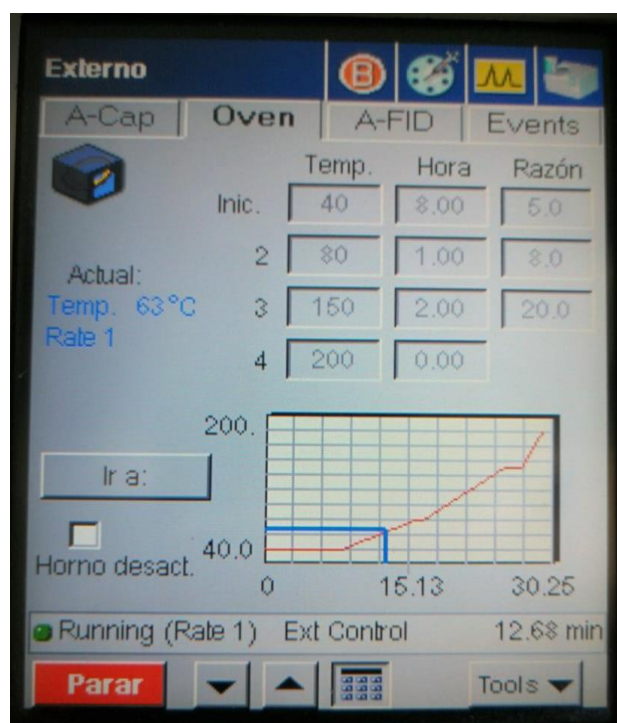


FIGURA 26: INTERFAZ DEL CROMATÓGRAFO DE GASES MODELO "CLARUS 500"

flujo	45 mL/min.
-------	------------

Así con lo mostrado en la tabla anterior se denota el sistema del modelo utilizado por dicho equipo antes mencionado, con lo que podemos darnos cuenta del rampeo y los valores del funcionamiento del equipo.

CAPITULO 3 RESULTADOS

TABLA 5: MATERIALES EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS

Procedimiento del Laboratorio:	RP-LAB-PM-03 Determinación de aldehídos, metanol y alcoholes superiores por el método cromatográfico.
Referencia:	NMX-V-005-NORMEX-2018 Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores- Método de Ensayo (prueba).
Clasificación del Método:	Verificación del método
Tipo de muestra	Mezcla hidroalcohólica.
Parámetros que evaluar	• Repetibilidad • Reproducibilidad • Recuperación • Sesgo • Incertidumbre • Linealidad • Intervalo de trabajo • Límite de cuantificación
Materiales	MATRAZ VOLUMETRICO 1 (50 mL) MATRAZ VOLUMETRICO 2 (50 mL) MATRAZ VOLUMETRICO 3 (50 mL) MATRAZ VOLUMETRICO 4 (50 mL) MATRAZ VOLUMETRICO 5 (50 mL) PIPETA VOLUMETRICA DE 1 mL CLASE A PIPETA VOLUMETRICA DE 2 mL CLASE A PIPETA VOLUMETRICA DE 4 mL CLASE A PIPETA VOLUMETRICA DE 6 mL CLASE A MICROPIPETA 1000 MICROLITRO
Reactivos (Nombre, Lote, Presentación y Capacidad)	Agua HPLC 4218-05 Frasco de vidrio 2.5 L Alcohol Etílico Absoluto 6197-03 Frasco de vidrio de 4L
Material de referencia	Metanol

certificado	12615000 99.5% pureza 1 mL 2-Butanol 126118400 99.5% pureza 1mL Propanol 12451600 99.3% pureza 1 mL Isobutanol 12602200 99.5% pureza 1 mL n-butanol 12525300 99.5% pureza 1 gramo Alcohol isoamílico 12525400 99.5% pureza 1 gramo Pentanol 12483500 99.5% pureza 1 gramo 2-Pentanol 12653300 96.6% pureza 1 gramo
Soluciones	Alcohol al 40%

3.1 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO METANOL

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 6: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO METANOL

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	11.93839273	12.176	0.141821144
	11.20207591	12.176	0.100092255
2	25.0496598	24.352	-0.079135906
	24.4890132	24.352	-0.061026807
3	47.70335146	48.704	0.065402444
	49.06874353	48.704	0.01819616
4	98.91387819	97.408	-0.177853384
	98.41896059	97.408	-0.99831771
5	144.2452207	146.112	1.89715719
	146.4747039	146.112	-0.33146328

TABLA 7: ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ANALITO METANOL

PENDIENTE	0.999613
INTERSECCIÓN	0.0254457
CORRELACIÓN	0.99980648
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999613
Tr	143.7483798
Tm	2.827879765

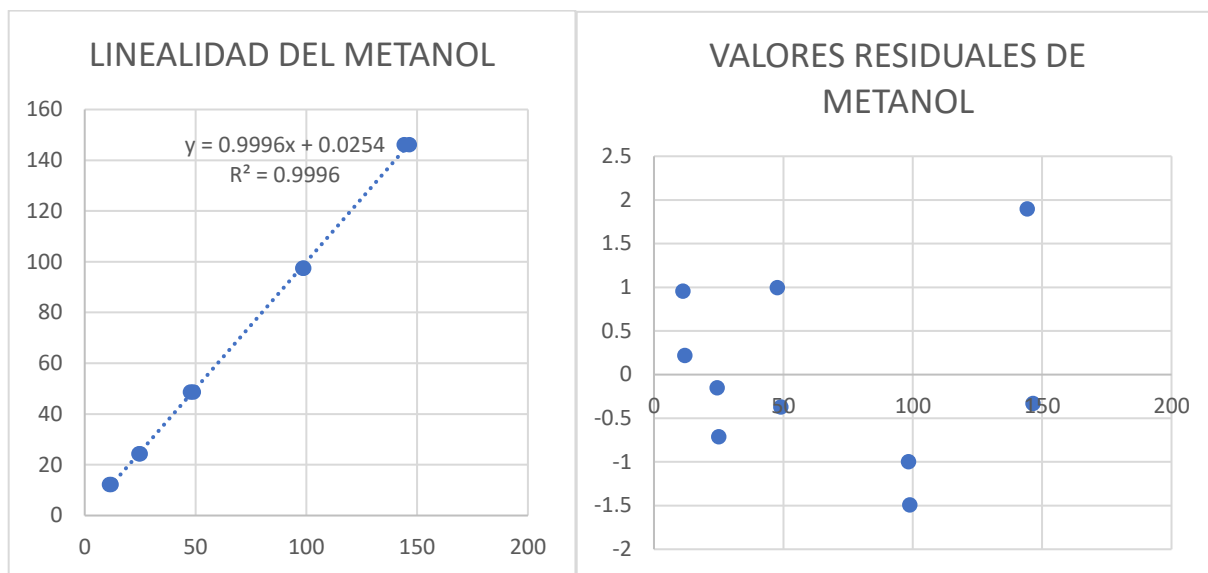


FIGURA 27 LINEALIDAD DEL ANALITO METANOL

FIGURA 26 VALORES RESIDUALES DEL ANALITO METANOL

TABLA 8: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO METANOL

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico > estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.1.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito METANOL obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 9: INYECCIONES REALIZADA EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO METANOL

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	96.94	108.91
	2	99.31	101.84
	3	101.28	99.58
	4	102.52	101.66
	5	99.31	99.60
	6	97.89	101.08
	7	95.90	98.89
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	237.05	234.39
	2	243.93	250.42
	3	238.57	239.12
	4	238.42	241.17
	5	248.80	239.59
	6	238.15	239.47
	7	237.37	240.69
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	777.66	794.07
	2	778.39	723.51
	3	779.56	759.38
	4	775.41	748.46
	5	722.69	750.27
	6	780.31	752.18
	7	778.18	757.60

3.1.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL ANALITO METANOL

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	693.1546	99.02208571	5.476997555
Columna 2	7	711.5536	101.6505143	11.52859395

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
datos	24.1802	1	24.18022864	2.843797422	0.11752895	4.74722535
días	102.034	12	8.502795753			
Total	126.214	13				

3.1.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	100.3363
s	3.11588705
%RSD	3.10544345
sr	2.91595538
si	1.49654043
spi	3.2775645
%r	2.90618189
%Pi	3.26657899

Análisis de varianza de un factor a concentración media
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	1682.2832	240.326171	19.2794102
Columna 2	7	1684.85905	240.69415	23.2802344

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.4739288	1	0.4739288	0.02227128	0.88384642	4.74722535
Dentro de los grupos	255.357868	12	21.2798223			
Total	255.831796	13				

3.1.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	241.308663
s	4.25071715
%RSD	1.76152696
sr	0.68842487
si	1.72402741
spi	1.85639417
%r	0.28528809
%Pi	0.76930275

Análisis de varianza de un factor a concentración alta

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	7	5392.2076	770.315371	443.389431
Día 2	7	5285.4614	755.065914	436.13119

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Días	813.910801	1	813.910801	1.8508055	0.19869662	4.74722535
Repeticiones	5277.12372	12	439.76031			
Total	6091.03452	13				

3.1.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	762.690643
s	21.6458106
%RSD	2.83808525
sr	3.46410162
si	7.92608992
spi	8.65002321
%r	0.45419485

%Pi	1.13414571
-----	-------------------

Criterio de aceptación:

$$\% r < 5 \%$$

$$\% Pi < 15 \%$$

3.1.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	98.04856049
2	92.00128045
3	102.8648973
4	100.5626363
5	97.94544896
6	100.7488985
7	101.5459492
8	101.037862
9	98.72236412
10	100.2482369
promedio	99.37261343
s	3.024323767

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

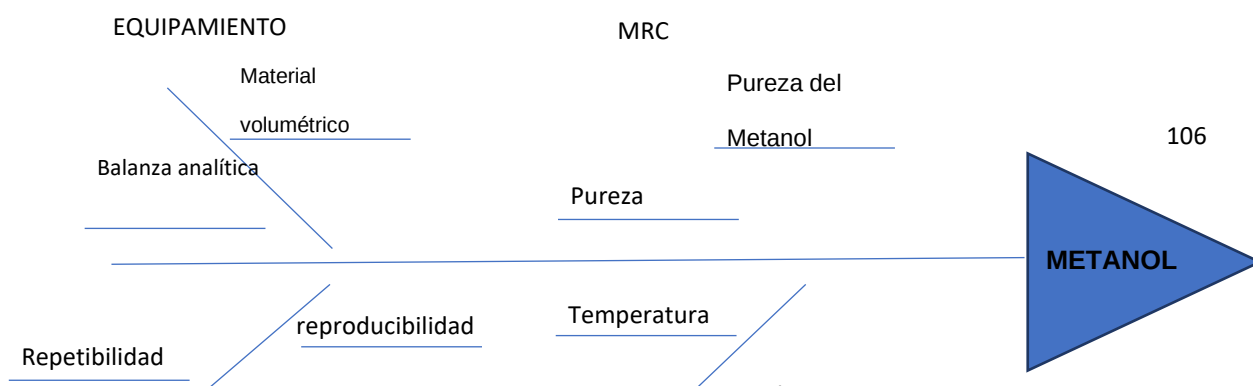
3.1.2.5 ANÁLISIS DE SESGO

Datos: De los resultados de recuperación de determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.8802291
Intervalo de confianza -	96.86499779

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.1.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DEL ANALITO METANOL



INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.95638
U_{rec-rel}	3.4579
U_{stotBAJA}	1.8745
U_{stotBAJA-rel}	8.7486

INCERTIDUMBRE TIPO B

U _{material}	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490
U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
U_{vmatraz1}	0.022422
U_{vmatraz2}	0.021402
U_{vmatraz3}	0.015385
U_{vMatraz4}	0.017497
U_{vMatraz5}	0.012129
U_{VMICROPIPETA 0.1}	0.200042
U_{VMICROPIPETA 0.5}	0.420496
U_{VMICROPIPETA 1}	0.089815
U _{equipos}	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
U_{eqBalanza}	0.000075
UMRC	0.288675

Incertidumbre combinanada	2.878637722
Incertidumbre exp. K=2	5.757275444

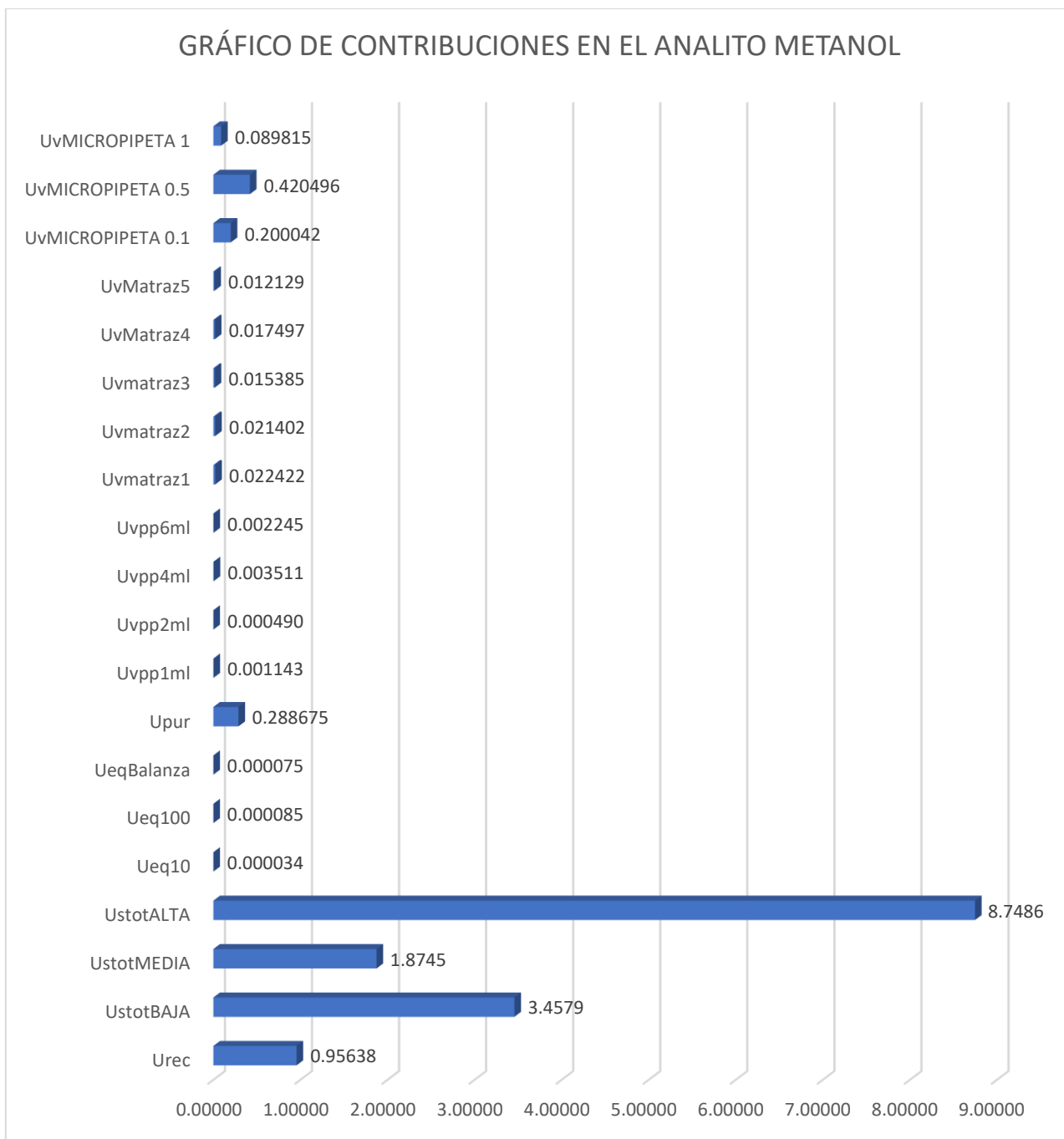


FIGURA 28 GRÁFICO DE CONTRIBUCIONES EN EL ANALITO METANOL

3.2 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO 2-BUTANOL

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 10: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO 2-BUTANOL

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	2.03865748	2.056	0.01497506
	1.98127071	2.056	0.07234683
2	4.15169523	4.112	-0.04151076
	4.17665201	4.112	-0.06646103
3	8.13206237	8.224	0.09116177
	8.22586967	8.224	-0.00262103
4	16.4278488	16.448	0.0215422
	16.6406165	16.448	-0.1911699
5	24.3779951	24.672	0.2974725
	24.8713321	24.672	-0.19573565

TABLA 11: ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ANALITO 2-BUTANOL

PENDIENTE	0.999738798
INTERSECCIÓN	0.002899968
CORRELACIÓN	0.999869391
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999738798
Tr	174.984722
Tm	2.82805771
Tb	8.3793E-07

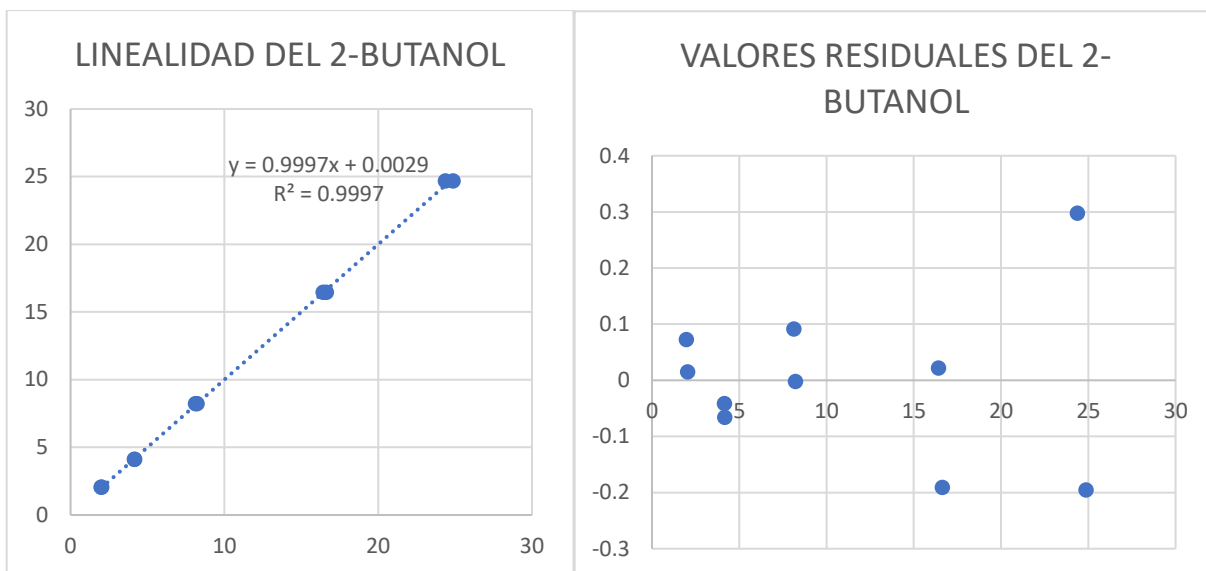


FIGURA 29: LINEALIDAD DEL ANALITO 2-BUTUNAL

FIGURA 30: VALORES RESIDUALES DEL ANALITO 2-BUTANOL

TABLA 12: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO 2-BUTANOL

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico>estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.2.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito 2-BUTANOL obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 13: INYECCIONES REALIZADAS EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO 2-BUTANOL

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	11.2226	10.7766
	2	11.2403	11.2077
	3	11.1682	11.4432
	4	11.1528	11.1684
	5	11.4277	11.3266
	6	11.4433	11.3378
	7	11.3556	11.3164
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	28.8282	28.6146
	2	28.9759	30.1943
	3	28.7527	29.0285
	4	28.6936	28.9166
	5	32.4413	28.9634
	6	28.8286	28.5165
	7	28.7995	29.038983
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	89.2329	86.9272
	2	85.7553	89.423
	3	89.3347	89.5385
	4	86.2112	85.7553
	5	90.0734	90.0249
	6	85.0846	85.2386
	7	87.4477	83.7576

3.2.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	79.0105	11.2872143	0.014564
Columna 2	7	78.5767	11.2252429	0.047263

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.01344	1	0.0134416	0.434816	0.522089	4.74722535
Dentro de los	0.37096	12	0.03091331			

grupos

Total 0.3844 13

3.2.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	11.2562286
s	0.17195736
%RSD	1.5276641
sr	0.17582182
si	0.04995957
spi	0.18278203
%r	1.56199582
%Pi	1.62383012

Análisis de varianza de un factor a concentración media

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	205.32	29.3314	1.888079
Columna 2	7	203.273	29.039	0.301441

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.29928	1	0.29928	0.273372	0.6106	4.747225
Dentro de los grupos	13.1371	12	1.09476			
Total	13.4364	13				

3.2.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	29.1852
s	1.01665
%RSD	3.48343
sr	1.04631
si	0.33711
spi	1.09927
%r	3.58506
%Pi	3.76654

Análisis de varianza de un factor a concentración alta

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	613.14	87.5914	3.912475
Columna 2	7	610.665	87.2379	6.039853

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.43744	1	0.43744	0.087907	0.771924	4.747225
Dentro de los grupos	59.714	12	4.97616			
Total	60.1514	13				

3.2.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	87.41464
s	2.151054
%RSD	2.460748
sr	2.230732
si	0.805226
spi	2.371614
%r	2.551897
%Pi	2.713063

Criterio de aceptación:

$$\% r < 5 \%$$

$$\% Pi < 15 \%$$

3.2.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución hidroalcohólica con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	99.1564921

2	96.3653071
3	100.965351
4	101.572277
5	98.8820813
6	100.022734
7	99.8774855
8	101.171063
9	98.8083459
10	100.807929
promedio	99.7629065
s	1.54465986

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

3.2.2.5 Análisis de sesgo

Datos: De los resultados de recuperación de determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.04366
Intervalo de confianza -	98.482153

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.2.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

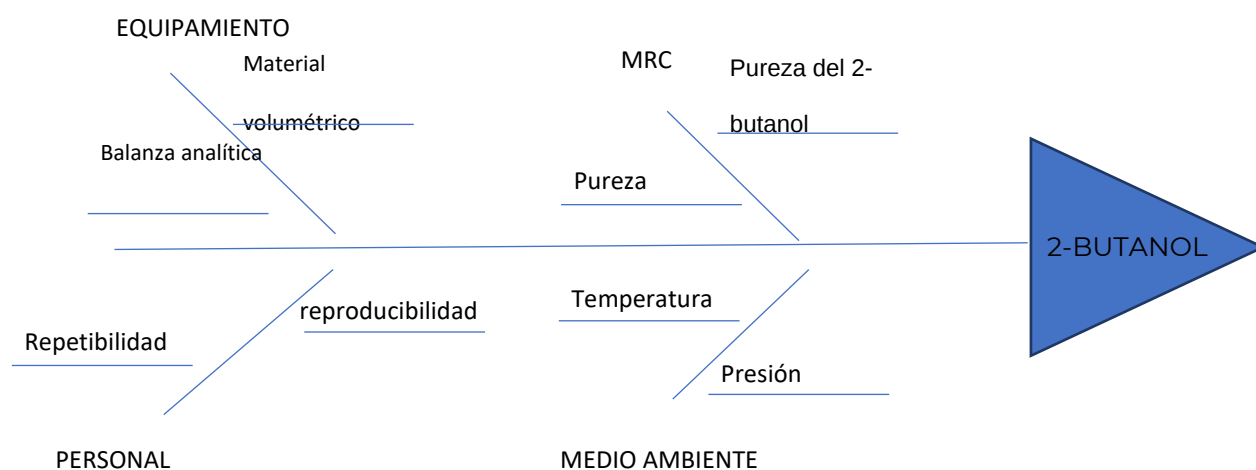


FIGURA 33: DIAGRAMA DE ISHIKAWA DEL ANALITO 2-BUTANOL

INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.48846
U_{rec-rel}	0.1945
U_{stotBAJA}	1.1682
U_{stotBAJA-rel}	2.5170

INCERTIDUMBRE TIPO B

U _{material}	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490
U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
U_{vmatraz1}	0.022422
U_{vmatraz2}	0.021402
U_{vmatraz3}	0.015385
U_{vMatraz4}	0.017497
U_{vMatraz5}	0.012129
U_{vMICROPIPETA 0.1}	0.200042
U_{vMICROPIPETA 0.5}	0.420496
U_{vMICROPIPETA 1}	0.089815
U _{equipos}	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
U_{eqBalanza}	0.000075
UMRC	0.288675

Incertidumbre combinanada	2.878637722
Incertidumbre exp. K=2	5.757275444

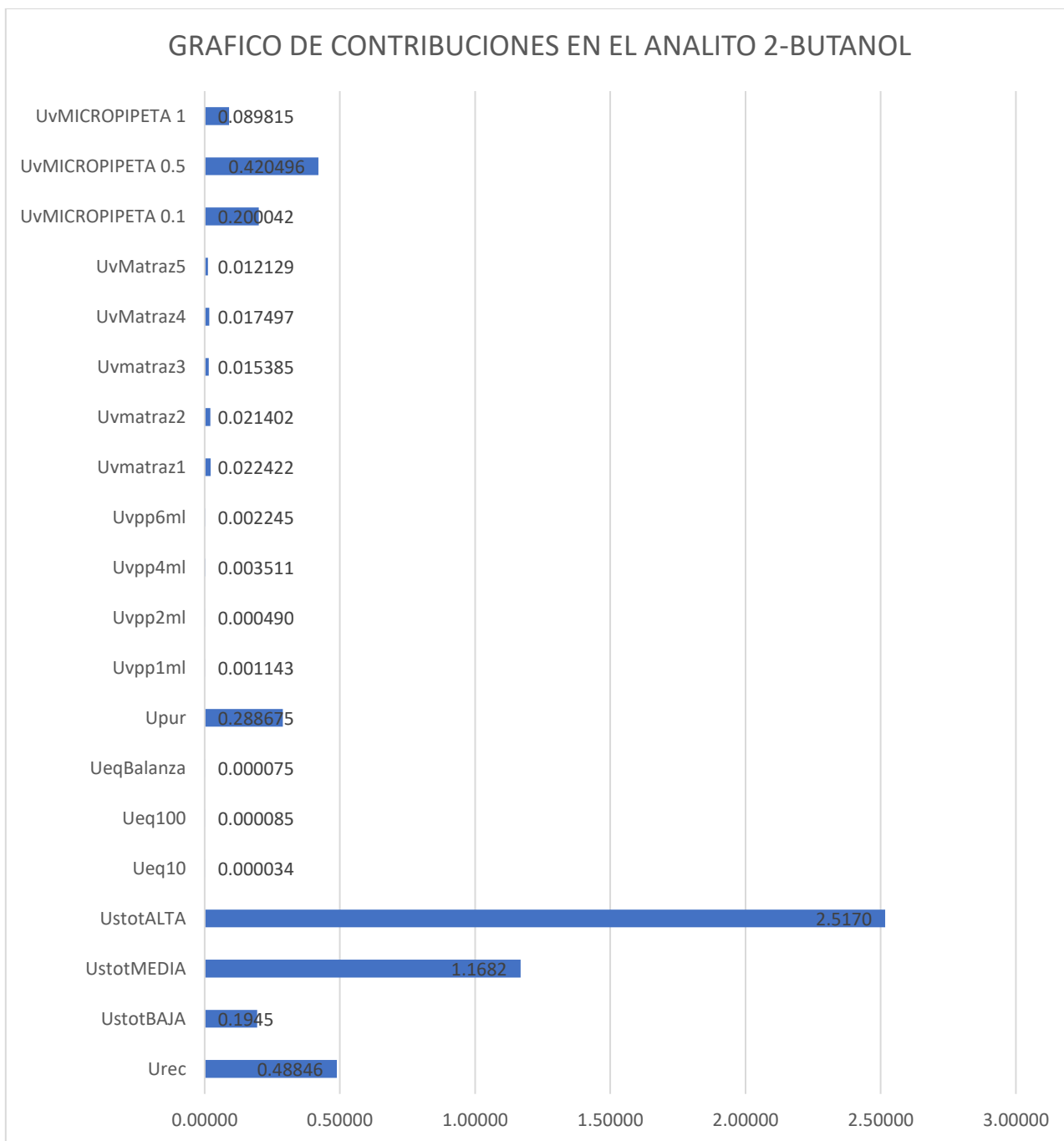


FIGURA 31: GRÁFICO DE CONTRIBUCIONES DEL ANALITO 2-BUTANOL

3.3 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO PROPANOL

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 14: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO PROPANOL

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	8.195894122	8.084	-0.12804641
	7.613378865	8.084	0.45420348
2	16.36176099	16.168	-0.20619321
	16.2201855	16.168	-0.06468223
3	31.56660824	32.326	0.7538863
	32.20233197	32.326	0.11845217
4	65.47802406	64.672	-0.79608076
	66.00400168	64.672	-1.32181877
5	95.7248674	97.008	1.30685522
	97.14894718	97.008	-0.1165758

TABLA 15: ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ANALITO PROPANOL

PENDIENTE	1.040811342
INTERSECCIÓN	-11.87310461
CORRELACIÓN	0.999772193
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999544438
Tr	132.486644
Tm	2.82778279
Tb	-5.6446E-05

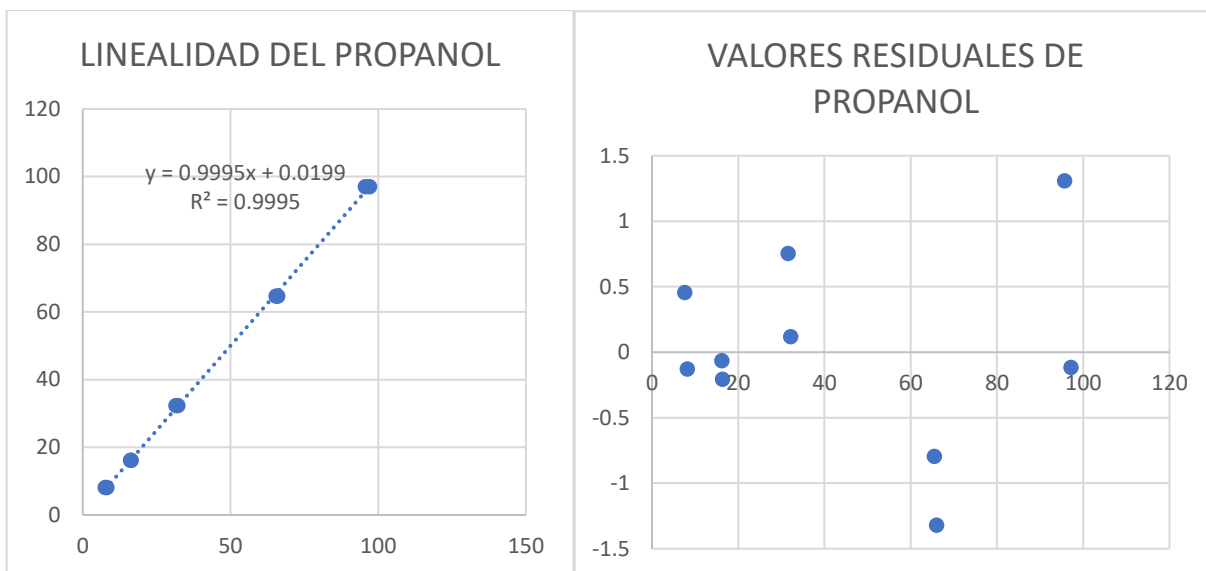


FIGURA 32: LINEALIDAD DEL ANALITO PROPANOL

FIGURA 33: VALORES RESIDUALES DEL ANALITO PROPANOL

TABLA 16: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO PROPANOL

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico > estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.3.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito PROPANOL obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 17: INYECCIONES REALIZADAS EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO PROPANOL

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	73.3045	79.8278
	2	74.0394	74.9263
	3	73.367	73.865
	4	74.018	73.8226
	5	73.8138	74.5264
	6	73.9025	73.1515
	7	72.9192	73.4814
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	145.9762	142.536
	2	151.6036	151.441
	3	145.6173	144.476
	4	148.0378	145.147
	5	148.4366	146.286
	6	147.085	143.658
	7	144.8212	145.591
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	424.4055	429.321
	2	420.0823	392.836
	3	421.7945	410.935
	4	417.6064	407.067
	5	394.2391	409.854
	6	416.5098	407.264
	7	421.6516	415.765

3.3.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	515.3644	73.6234857	0.18437498
Columna 2	7	523.601	74.8001429	5.27589589

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4.84582711	1	4.84582711	1.77494019	0.20752013	4.7472253
Dentro de los grupos	32.7616252	12	2.73013543			
Total	37.6074523	13				

3.3.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	74.211814
s	1.7008471
%RSD	2.2918819
sr	3.4641016
si	0.5497651
spi	3.5074552
%r	4.6678573
%Pi	4.726276

Análisis de varianza de un factor a concentración media

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	1031.5777	147.368243	5.18319699
Columna 2	7	1019.13443	145.590633	8.20243969

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	11.0596347	1	11.0596347	1.652463	0.22287859	4.74722535
Dentro de los grupos	80.31382	12	6.69281834			

3.3.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	146.479438
s	2.6511747
%RSD	1.80992959
sr	3.46410162
si	0.78982967
spi	3.55300308
%r	2.36490641
%Pi	2.42559852

Análisis de varianza de un factor a concentración alta

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	2916.2892	416.612743	104.430571
Columna 2	7	2873.042	410.434571	119.47005

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	133.594308	1	133.594308	1.19333575	0.29610395	4.74722535
Dentro de los grupos	1343.40372	12	111.95031			
Total	1476.99803	13				

3.3.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	413.523657
s	10.6590447
%RSD	2.57761424
sr	3.46410162
si	1.75840827
spi	3.88484229
%r	0.83770337
%Pi	0.93944862

Criterio de aceptación:

$$\% r < 5 \%$$

$$\% P_i < 15 \%$$

3.3.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	101.384143
2	94.178363
3	101.198423
4	100.32277
5	97.6508329
6	99.6174348
7	101.246326
8	102.059627
9	98.677292
10	100.145294
promedio	99.6480506
s	2.34141512

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

3.3.2.5 ANÁLISIS DE SESGO

Datos: De los resultados de recuperación se determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.589433
Intervalo de confianza -	97.7066681

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.3.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Diagrama de Ishikawa

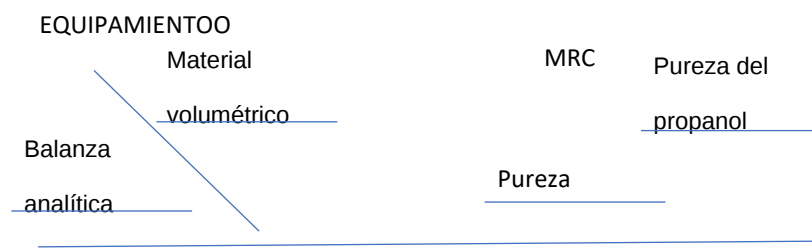




FIGURA 34: DIAGRAMA DE ISHIKAWA DEL ANALITO PROPANOL
 INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.74042
U_{rec-rel}	3.7439
U_{stotBAJA}	3.7866
U_{stotBAJA-rel}	4.0995

INCERTIDUMBRE TIPO B

U _{material}	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490
U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
U_{vmatraz1}	0.022422
U_{vmatraz2}	0.021402
U_{vmatraz3}	0.015385
U_{vMatraz4}	0.017497
U_{vMatraz5}	0.012129
U_{vMICROPIPETA 0.1}	0.200042
U_{vMICROPIPETA 0.5}	0.420496
U_{vMICROPIPETA 1}	0.089815
U _{equipos}	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
U_{eqBalanza}	0.000075
UMRC	0.288675

Incetidumbre combinanada	6.789628474
--------------------------	-------------

Incertidumbre exp. K=2

13.57925695

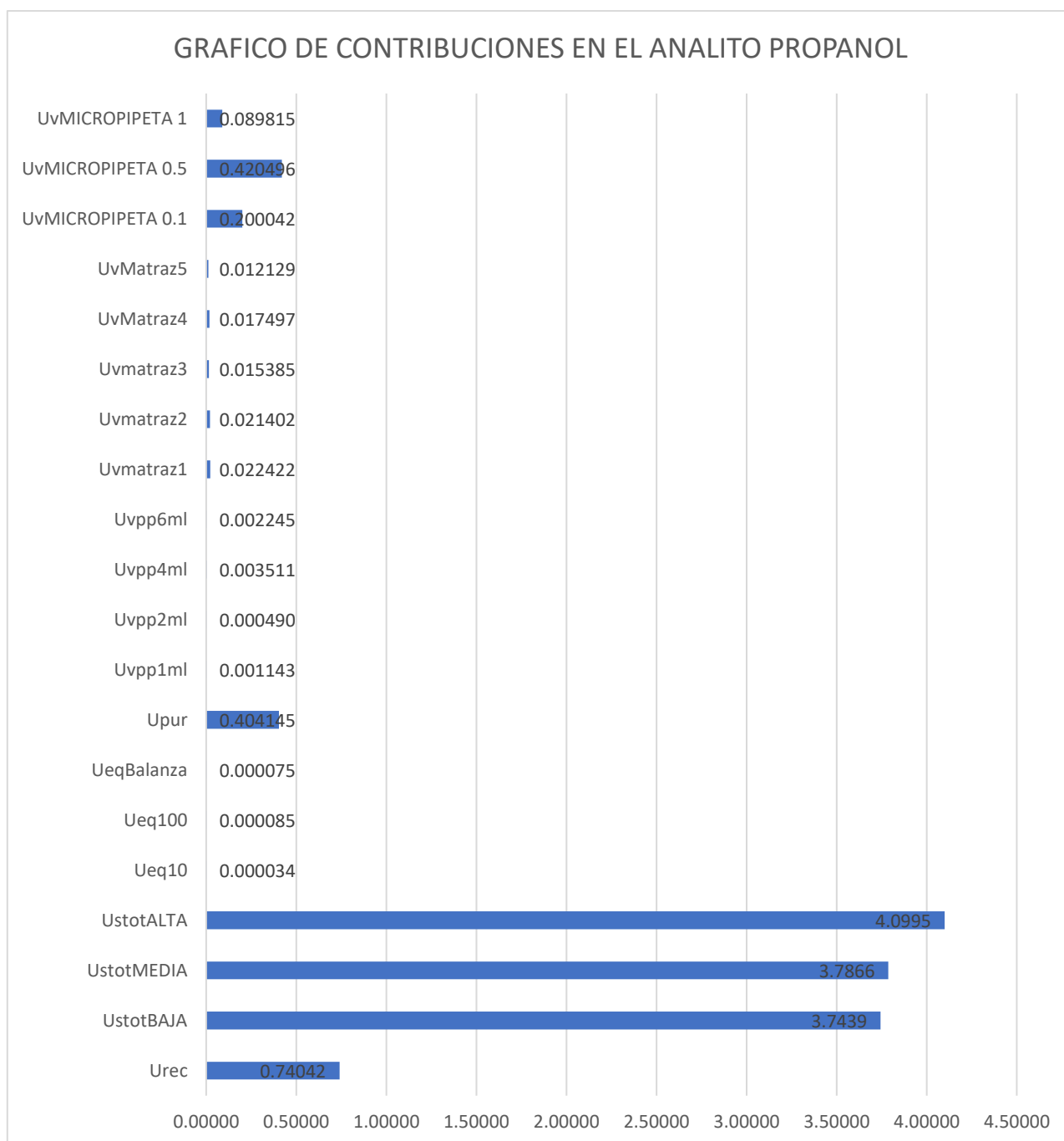


FIGURA 35: GRÁFICO DE CONTRIBUCIONES DEL ANALITO PROPANOL

3.4 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO ISOBUTANOL

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 18: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO ISOBUTANOL

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	7.61019123	7.772	0.142961916
	7.42884722	7.772	0.324206458
2	15.8381099	15.544	-0.308443486
	15.6980669	15.544	-0.168477311
3	30.5098058	31.088	0.571908532
	30.9718179	31.088	0.110149934
4	62.7552171	62.176	-0.567815055
	63.2537377	62.176	-1.066062165
5	91.5848818	93.264	1.706334295
	94.0373245	93.264	-0.744763117

TABLA 19: ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ANALITO ISOBUTANOL

PENDIENTE	0.999612996
INTERSECCIÓN	0.025445698
CORRELACIÓN	0.999806479
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999612996
Tr	143.74838
Tm	2.82810827
Tb	1.3609E-07

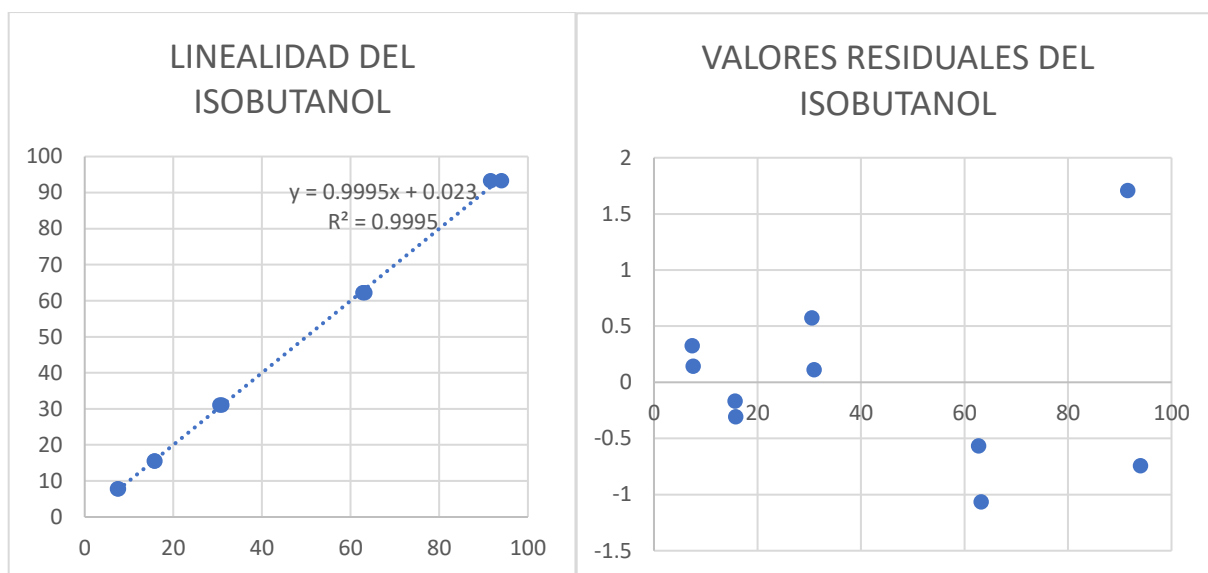


FIGURA 36: LINEALIDAD DEL ANALITO ISOBUTANOL

FIGURA 37: VALORES RESIDUALES DEL ANALITO ISOBUTANOL

TABLA 20: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO ISOBUTANOL

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico > estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.4.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito ISOBUTANOL obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 21: INYECCIONES REALIZADAS EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO ISOBUTANOL

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	47.5836	48.8847
	2	47.598	47.7989
	3	48.297	48.0985
	4	48.1289	47.755
	5	47.7432	48.127
	6	48.1404	46.6173
	7	47.6781	46.6221
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	120.3031	119.9919
	2	120.0842	124.5302
	3	121.021	120.7881
	4	120.1665	117.8791
	5	127.4496	120.3251
	6	121.1261	118.2357
	7	120.6121	120.29168
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	371.5048	379.477
	2	372.4211	370.401
	3	375.4495	377.459
	4	378.5009	371.955
	5	373.6729	374.073
	6	380.5279	373.726
	7	387.9253	375.074

3.4.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	335.1692	47.8813143	0.088415
Columna 2	7	333.9035	47.7005	0.681926

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.11443	1	0.11442832	0.297085	0.59570109	4.74722535
Dentro de los grupos	4.62205	12	0.38517072			
Total	4.73648	13				

3.4.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	47.7909071
s	0.60360946
%RSD	1.26302155
sr	0.62062123
si	0.19666592
spi	0.65103625
%r	1.29861781
%Pi	1.36225966

Análisis de varianza de un factor a concentración media

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	850.763	121.538	6.96013
Columna 2	7	842.042	120.292	4.725011

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.43233	1	5.43233	0.929785	0.35395	4.747225
Dentro de los grupos	70.1108	12	5.84257			
Total	75.5432	13				

3.4.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	120.915
s	2.4106
%RSD	1.99364
sr	2.41714
si	0.24209
spi	2.42923
%r	1.99905
%Pi	2.00905

Análisis de varianza de un factor a concentración alta
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	2640	377.143	33.09243
Columna 2	7	2622.17	374.595	9.643064

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	22.7246	1	22.7246	1.0635	0.322756	4.747225
Dentro de los grupos	256.413	12	21.3677			
Total	279.138	13				

3.4.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	375.8692
s	4.633802
%RSD	1.232823
sr	4.622526
si	0.440267
spi	4.643445
%r	1.229823
%Pi	1.235389

Criterio de aceptación:

$$\% r < 5 \%$$

% Pi < 15 %

3.4.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	97.91805498
2	95.58475575
3	101.8921122
4	100.9911666
5	98.14013711
6	99.62627976
7	100.9315767
8	101.733366
9	98.19960734
10	100.8291779
promedio	99.58462343
s	2.056591006

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

3.4.2.5 ANÁLISIS DE SESGO

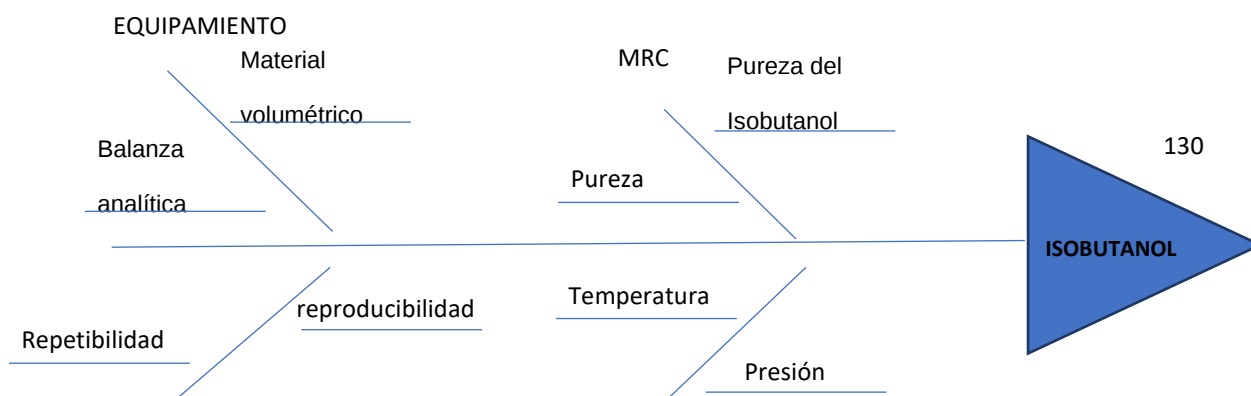
Datos: De los resultados de recuperación de determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.2898442
Intervalo de confianza -	97.87940264

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.4.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Diagrama de Ishikawa



INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.65035
U_{rec-rel}	0.6920
U_{stotBAJA}	2.5953
U_{stotBAJA-rel}	4.9613

INCERTIDUMBRE TIPO B

U _{material}	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490
U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
U_{vmatraz1}	0.022422
U_{vmatraz2}	0.021402
U_{vmatraz3}	0.015385
U_{vMatraz4}	0.017497
U_{vMatraz5}	0.012129
U_{vMICROPIPETA 0.1}	0.200042
U_{vMICROPIPETA 0.5}	0.420496
U_{vMICROPIPETA 1}	0.089815
U _{equipos}	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
U_{eqBalanza}	0.000075
UMRC	0.288675

Incertidumbre combinanada	5.706284349
Incertidumbre exp. K=2	11.4125687

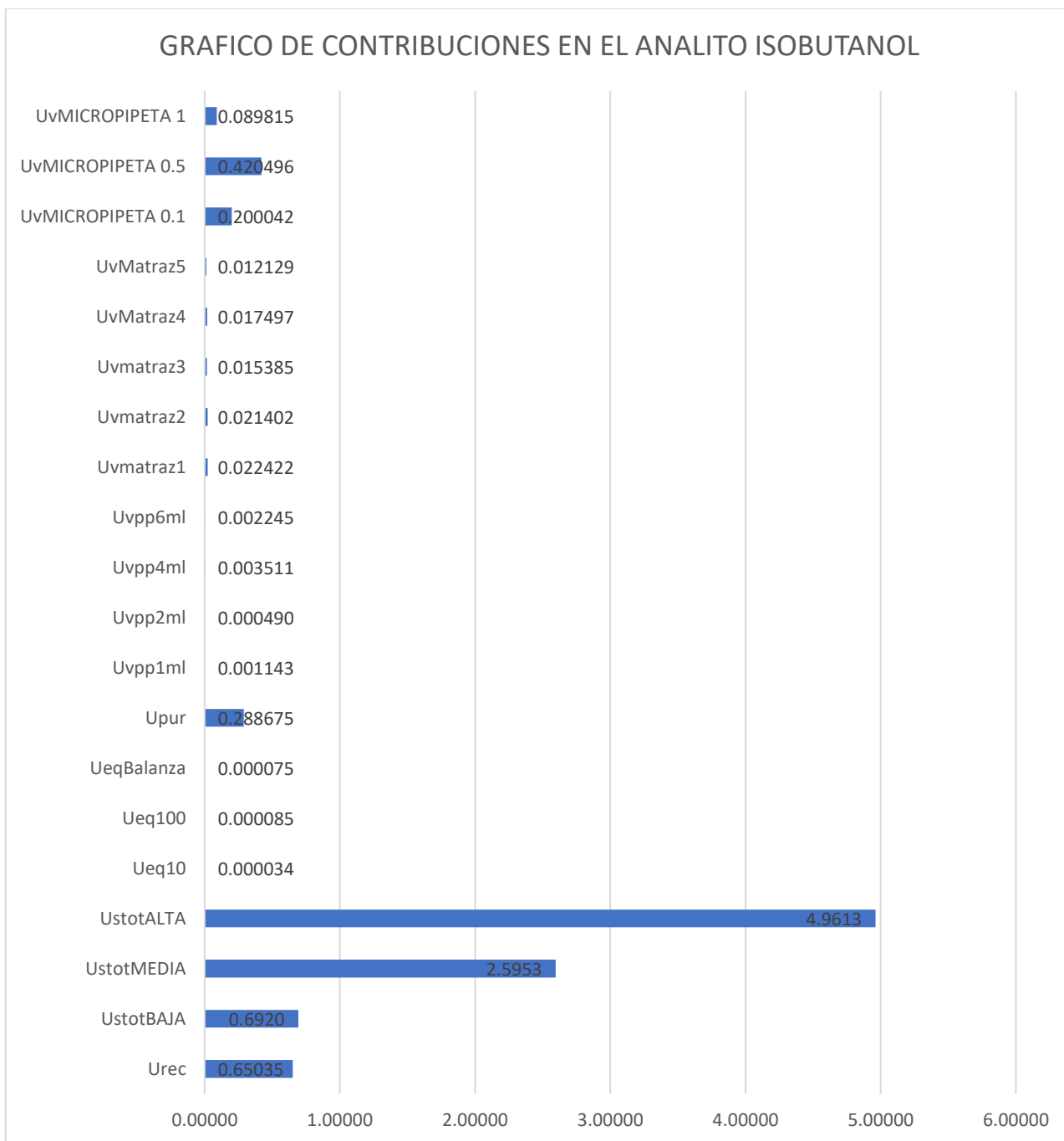


FIGURA 39: GRÁFICO DE CONTRIBUCIONES DEL ANALITO ISOBUTANOL

3.5 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO N-BUTANOL

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 22: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO N-BUTANOL

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	1.91283671	2.06	0.141821144
	1.95458982	2.06	0.100092255
2	4.1951174	4.12	-0.079135906
	4.17699779	4.12	-0.061026807
3	8.17288602	8.24	0.065402444
	8.22011969	8.24	0.01819616
4	16.6610647	16.48	-0.177853384
	16.837213	16.48	-0.353899499
5	24.2824631	24.72	0.445168329
	24.8267118	24.72	-0.098764736

TABLA 23: ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ANALITO N-BUTANOL

PENDIENTE	0.99942004
INTERSECCIÓN	0.00645152
CORRELACIÓN	0.99970998
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.99942004
Tr	117.413607
Tm	2.82760681
Tb	1.8529E-06

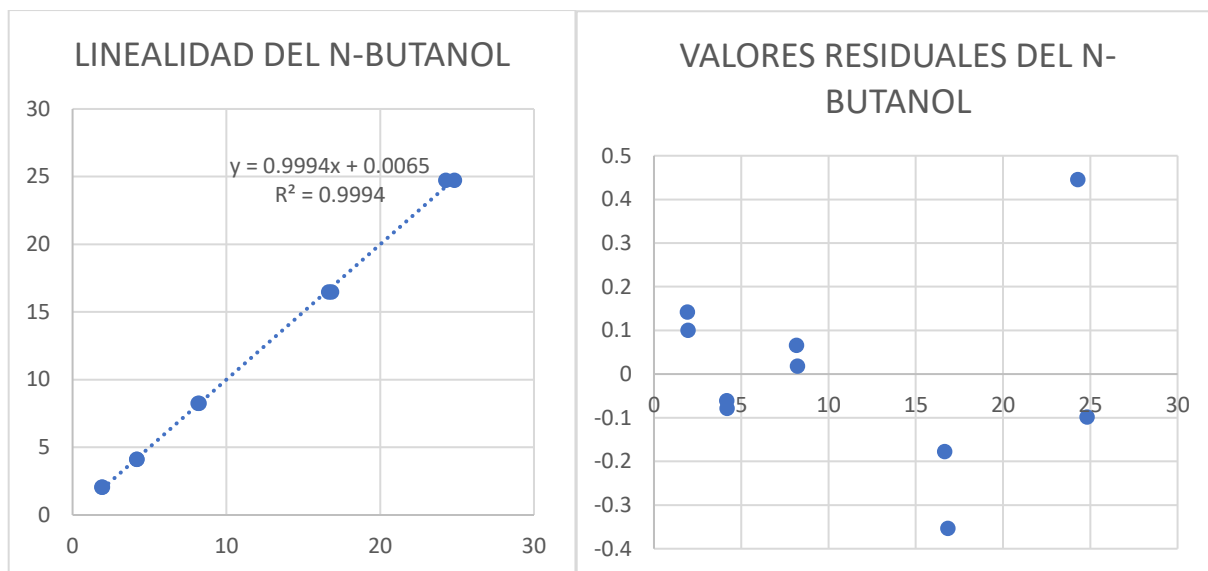


FIGURA 40: LINEALIDAD DEL ANALITO N-BUTANOL

FIGURA 41: VALORES RESIDUALES DEL ANALITO N-BUTANOL

TABLA 24: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO N-BUTANOL

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico > estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.5.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito N-BUTANOL obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 25: INYECCIONES REALIZADAS EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO N-BUTANOL

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	16.465	16.0818
	2	16.2025	16.7642
	3	16.6965	16.6681
	4	16.6561	16.7511
	5	16.4429	16.726
	6	16.4853	16.4977
	7	16.4479	16.5703
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	41.5305	41.9108
	2	43.1269	43.1367
	3	41.9309	41.6456
	4	42.1775	42.4899
	5	44.9606	40.0936
	6	42.1623	41.4775
	7	41.9291	41.7924
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	133.0012	138.833
	2	136.3442	128.756
	3	136.9284	132.24
	4	134.551	131.409
	5	130.1615	133.43
	6	134.6003	135.255
	7	136.7057	134.057

3.5.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	115.3962	16.4851714	0.02622707
Columna 2	7	116.0592	16.5798857	0.05789216

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.03139779	1	0.03139779	0.7465067	0.40452421	4.74722535
Dentro de los grupos	0.5047154	12	0.04205962			
Total	0.53611319	13				

3.5.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	16.5364
s	0.21895
%RSD	1.32406
sr	0.20508
si	0.03903
spi	0.20876
%r	1.2402
%Pi	1.26245

Análisis de varianza de un factor a concentración media

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	297.8178	42.5454	1.37348454
Columna 2	7	292.54645	41.79235	0.88571683

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.98479506	1	1.98479506	1.75707671	0.20967179	4.74722535

Dentro de los grupos	13.5552082	12	1.12960069
Total	15.5400033	13	

3.5.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	42.2202333
s	1.1797183
%RSD	2.79420129
sr	1.06282674
si	0.34952915
spi	1.11882586
%r	2.51733981
%Pi	2.64997556

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	942.2923	134.613186	5.8592134
Columna 2	7	933.9801	133.425729	10.0428012

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.93519063	1	4.93519063	0.62070005	0.44607106	4.74722535
Dentro de los grupos	95.4120874	12	7.95100729			
Total	100.347278	13				

3.5.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
--------	------------

$\bar{x}$	134.019457
s	2.77831269
%RSD	2.07306666
sr	2.81975305
si	0.65637714
spi	2.89514045
%r	2.10398782
%Pi	2.1602389

Criterio de aceptación:

$$\% r < 5 \%$$

$$\% Pi < 15 \%$$

3.5.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	92.85615103
2	94.88300074
3	101.8232379
4	101.3834416
5	99.1855099
6	99.75873415
7	101.0986935
8	102.1675544
9	98.23002876
10	100.4316821
promedio	99.1818034
s	3.085955287

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

3.5.2.5 Análisis de sesgo

Datos: De los resultados de recuperación de determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.7405208
Intervalo de confianza -	96.62308604

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.5.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Diagrama de Ishikawa

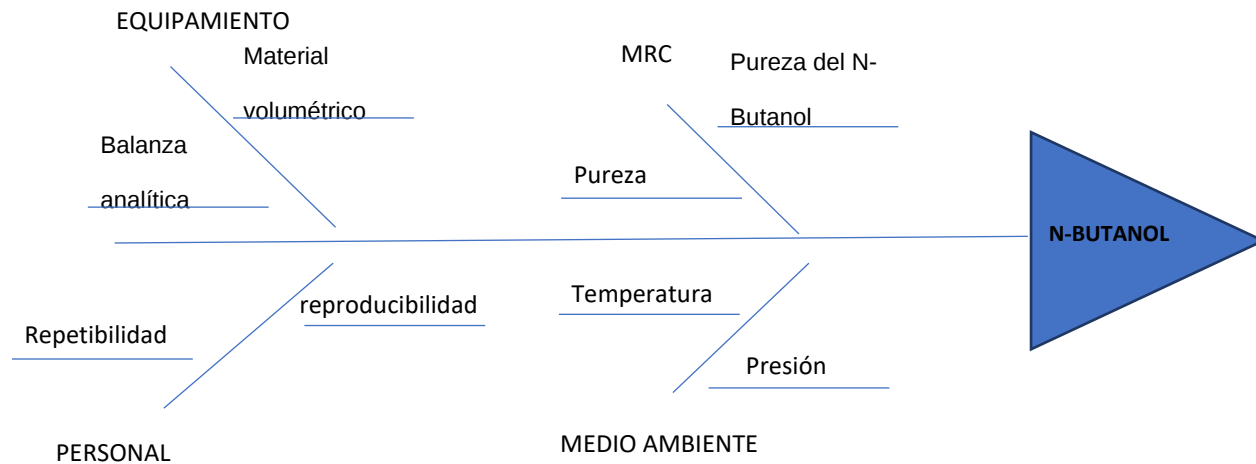


FIGURA 42: DIAGRAMA DE ISHIKAWA DEL ANALITO N-BUTANOL

INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.97586
$U_{rec-rel}$	0.2227
$U_{stotBAJA}$	1.1888
$U_{stotBAJA-rel}$	3.0851

INCERTIDUMBRE TIPO B

$U_{material}$	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490

U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
$U_{vmatriz1}$	0.022422
$U_{vmatriz2}$	0.021402
$U_{vmatriz3}$	0.015385
$U_{vMatraz4}$	0.017497
$U_{vMatraz5}$	0.012129
$U_{vMICROPIPETA\ 0.1}$	0.200042
$U_{vMICROPIPETA\ 0.5}$	0.420496
$U_{vMICROPIPETA\ 1}$	0.089815
Uequipos	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
$U_{eqBalanza}$	0.000075
UMRC	0.288675

Incertidumbre combinada	3.4989492
Incertidumbre exp. K=2	6.9978984

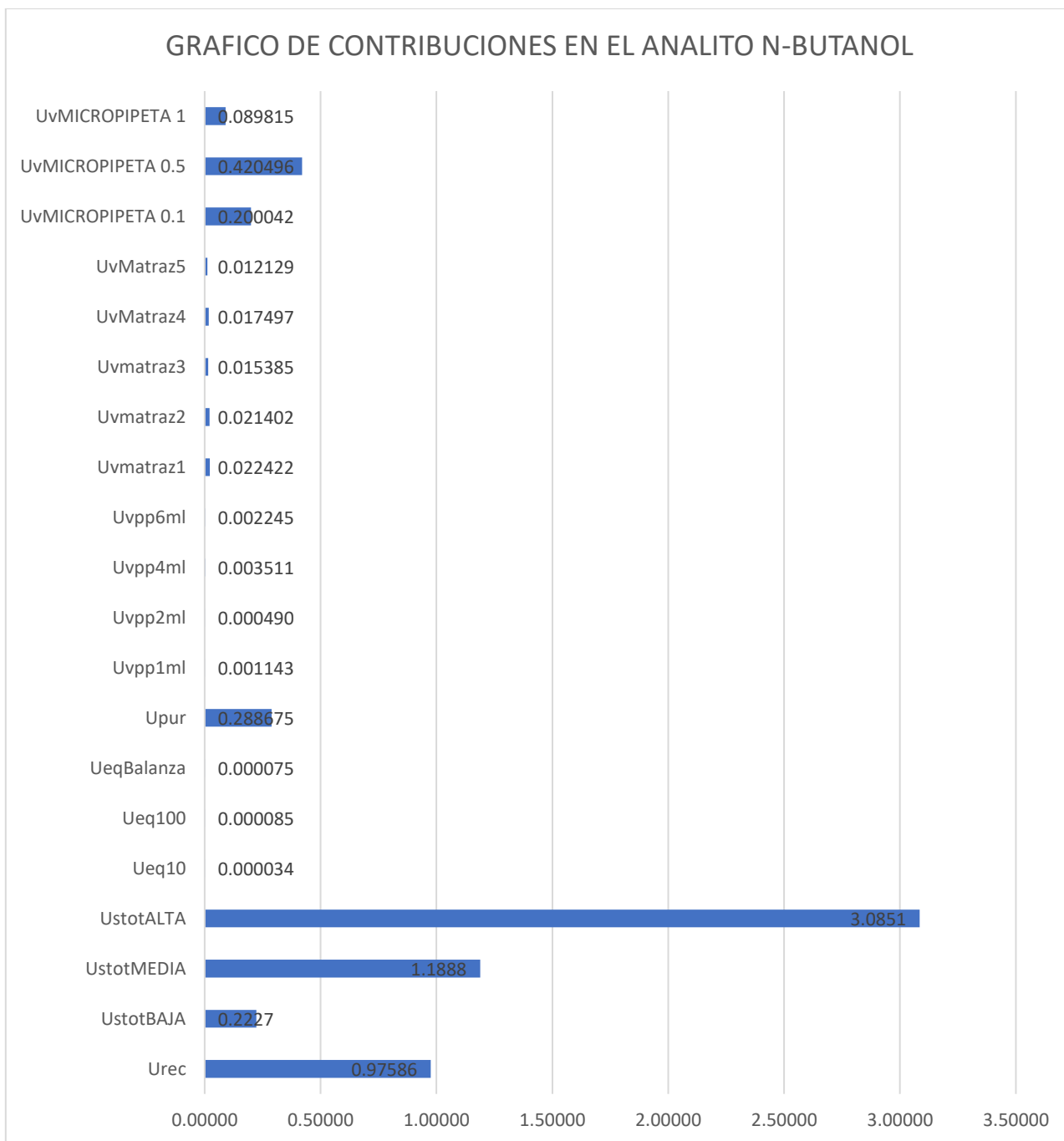


FIGURA 43: GRÁFICO DE CONTRIBUCIONES DEL ANALITO N-BUTANOL

3.6 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO PENTANOL

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 26: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO PENTANOL

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	1.047033498	1.076	0.02704579
	1.022016144	1.076	0.05205305
2	2.18014172	2.152	-0.02960554
	2.161000147	2.152	-0.01047168
3	4.233729695	4.304	0.06963455
	4.317012941	4.304	-0.01361511
4	8.689137477	8.608	-0.07997669
	8.776636065	8.608	-0.16744
5	12.73329429	12.912	0.18149721
	12.94399802	12.912	-0.02912157

TABLA 27: ESTADISTICO OBTENIDO DEL ANALITO PENTANOL

PENDIENTE	0.999612996
INTERSECCIÓN	0.025445698
CORRELACIÓN	0.999806479
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999612996
Tr	143.74838
Tm	2.82790271
Tb	5.1288E-05

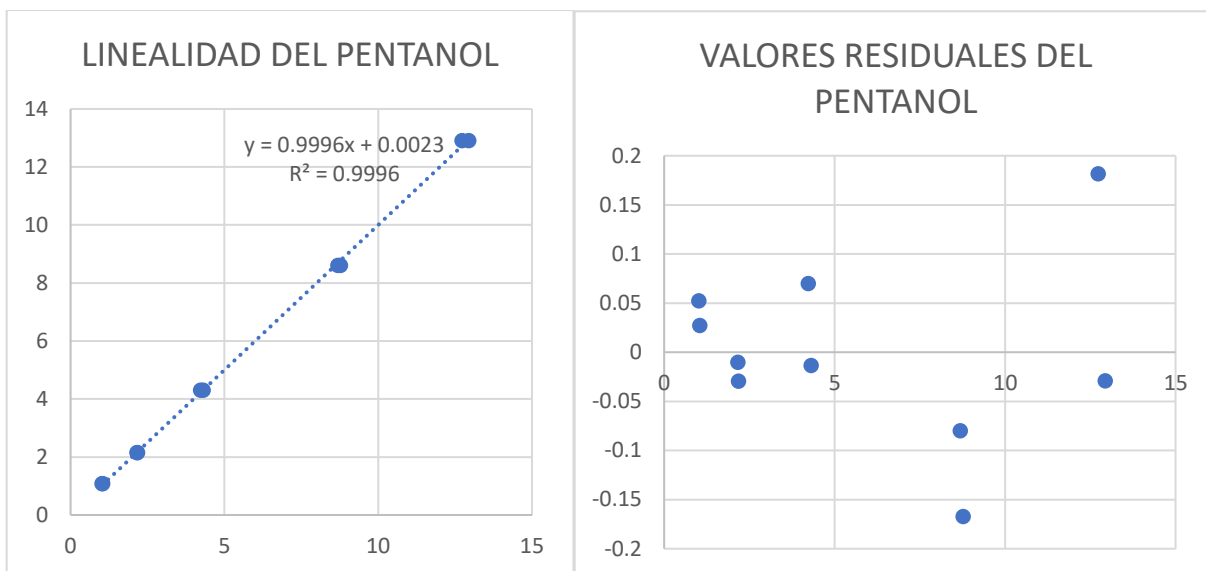


FIGURA 44: LINEALIDAD DEL ANALITO PENTANOL

FIGURA 45: VALORES RESIDUALES DEL ANALITO PENTANOL

TABLA 28: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO PENTANOL

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico>estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.6.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito PENTANOL obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 29: INYECCIONES REALIZADAS EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO PENTANOL

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	23.5782	24.4737
	2	25.5331	23.1273
	3	23.626	23.1923
	4	23.4713	23.8492
	5	23.2364	23.9636
	6	23.0179	23.7411
	7	23.3015	23.3678
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	59.8555	59.7488
	2	62.2877	61.5943
	3	60.1295	59.988
	4	60.378	59.898
	5	69.7158	60.1686
	6	60.1349	59.7749
	7	59.7623	60.1954
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	197.5025	201.421
	2	196.4583	184.803
	3	198.035	192.473
	4	196.384	191.505
	5	196.3112	193.763
	6	195.798	192.14
	7	198.8447	195.988

3.6.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	7	165.7644	23.6806286	0.71153857
Columna 2	7	165.715	23.6735714	0.23054311

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00017431	1	0.00017431	0.00037006	0.98496833	4.74722535
Dentro de los grupos	5.65249003	12	0.47104084			
Total	5.65266434	13				

3.6.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	23.6771
s	0.65941
%RSD	2.78501
sr	0.68632
si	0.25936
spi	0.73369
%r	2.89868
%Pi	3.09875

Análisis de varianza de un factor a concentración media

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	432.2637	61.7519571	13.066683
Columna 2	7	421.368033	60.1954333	0.41089546

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.47968229	1	8.47968229	1.25833915	0.28391097	4.74722535
Dentro de los grupos	80.8654707	12	6.73878922			
Total	89.345153	13				

3.6.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
--------	------------

$\bar{x}$	60.9736952
s	2.62158427
%RSD	4.2995332
sr	2.5959178
si	0.49869731
spi	2.64338575
%r	4.25743887
%Pi	4.33528875

Análisis de varianza de un factor a concentración alta

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	1379.3337	197.047671	1.21714762
Columna 2	7	1352.0936	193.156229	25.1152539

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	53.0016463	1	53.0016463	4.02558394	0.06788984	4.74722535
Dentro de los grupos	157.994409	12	13.1662008			
Total	210.996055	13				

3.6.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	195.10195
s	4.02870523
%RSD	2.0649231
sr	3.62852597
si	2.38553515
spi	4.34246228
%r	1.8598102
%Pi	2.22574007

Criterio de aceptación:

$$\% r < 5 \%$$

% Pi < 15 %

3.6.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	97.3079459
2	94.982913
3	101.307701
4	100.418222
5	98.3673256
6	100.302345
7	100.942582
8	101.959062
9	98.6159719
10	100.247816
promedio	99.4451885
s	2.12617343

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

3.6.2.5 ANÁLISIS DE SESGO

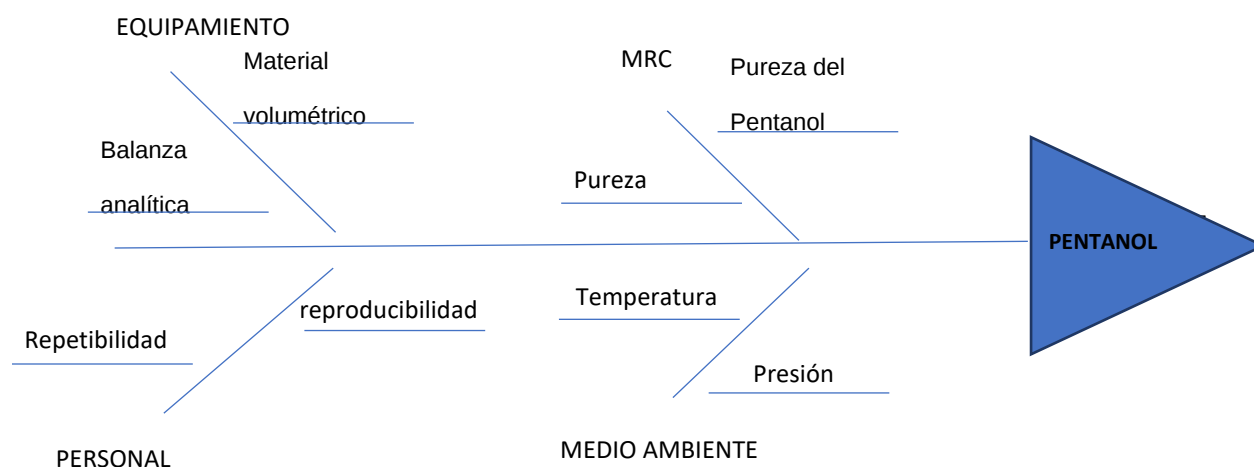
Datos: De los resultados de recuperación de determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.208104
Intervalo de confianza -	97.6822735

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.6.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Diagrama de Ishikawa



INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.67236
U_{rec-rel}	0.7782
U_{stotBAJA}	2.8196
U_{stotBAJA-rel}	4.5539

INCERTIDUMBRE TIPO B

U _{material}	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490
U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
U_{vmatraz1}	0.022422
U_{vmatraz2}	0.021402
U_{vmatraz3}	0.015385
U_{vMatraz4}	0.017497
U_{vMatraz5}	0.012129
U_{vMICROPIPETA 0.1}	0.200042
U_{vMICROPIPETA 0.5}	0.420496
U_{vMICROPIPETA 1}	0.089815
U _{equipos}	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
U_{eqBalanza}	0.000075
UMRC	0.288675

Incertidumbre combinanada	5.482298813
Incertidumbre exp. K=2	10.96459763

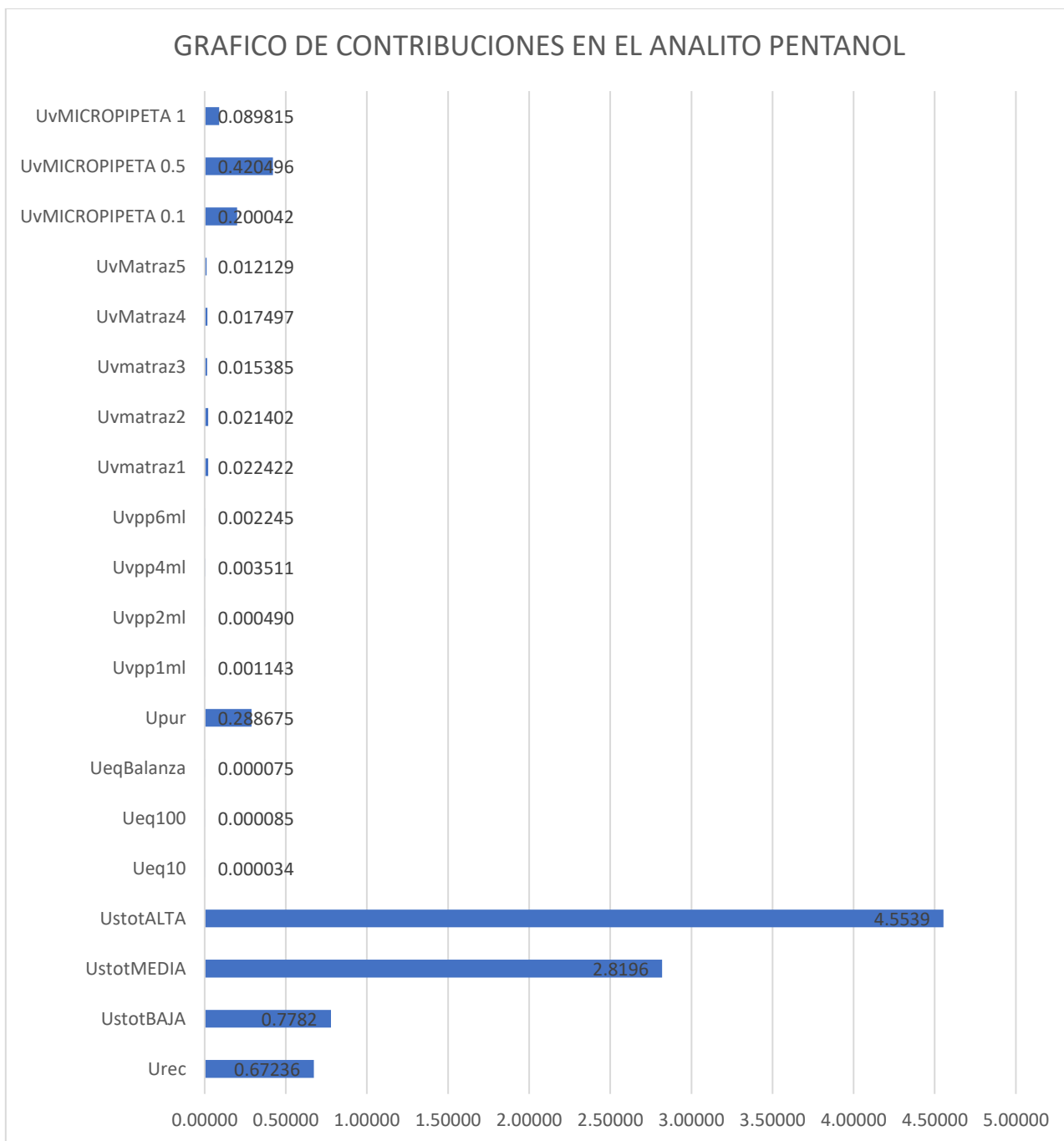


FIGURA 47: GRÁFICO DE CONTRIBUCIONES DEL ANALITO PENTANOL

3.7 LINEALIDAD E INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALITO ISOAMÍLICO

Datos: Se prepara una curva de calibración a 5 niveles, cada nivel se realiza por duplicado y con lo cual se determina la gráfica de linealidad, gráfica de residuales, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, estadístico de coeficiente de correlación, estadístico de pendiente y estadístico de intersección.

TABLA 30: CONCENTRACIONES DE LOS PUNTOS ELABORADOS DEL ANALITO ISOAMÍLICO

Nivel	Conc. Obtenido mg/100 ml	Conc. Calculado mg/100 mL	Residual
1	11.5745047	11.812	0.21993922
	11.2869462	11.812	0.50740117
2	24.0146032	23.634	-0.39398404
	23.903361	23.634	-0.28277922
3	46.4253963	47.248	0.81674455
	47.1759775	47.248	0.06641521
4	95.6217506	94.976	-0.63509814
	96.6149496	94.976	-1.62796378
5	139.951208	141.744	1.81832294
	142.259303	141.744	-0.48899791

TABLA 31: ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ANALITO ISOAMÍLICO

PENDIENTE	0.999612996
INTERSECCIÓN	0.025445698
CORRELACIÓN	0.999806479
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999612996
Tr	143.74838
Tm	2.8278071
Tb	3.8619E-08

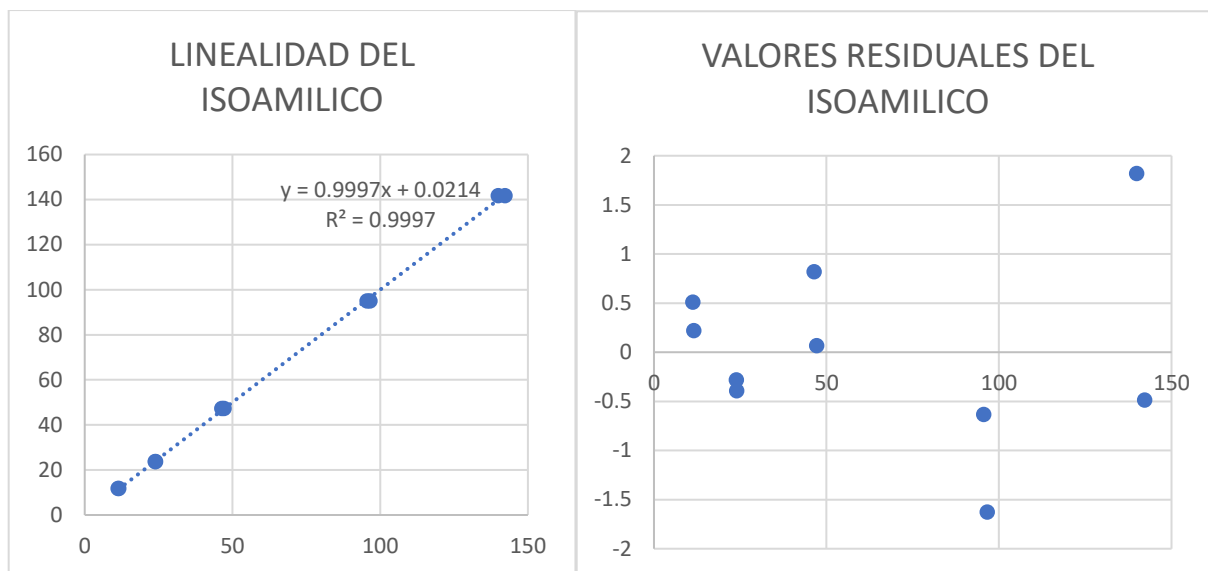


FIGURA 48: LINEALIDAD DEL ANALITO ISOAMÍLICO

FIGURA 49: VALORES RESIDUALES DEL ANALITO ISOAMÍLICO

TABLA 32: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DEL ANALITO ISOAMÍLICO

parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación	> 0.995
Coeficiente de determinación	>0.98
Estadístico de correlación	Valor del estadístico > estadístico de tabla (2.3060)
Estadístico de pendiente	El valor del estadístico debe de ser > al de tablas (2.3060)
Estadístico de intercepto	El valor estadístico debe ser menor al de tablas (2.3060)

3.7.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Datos: Se analizaron 3 muestras de mezcla hidroalcohólica de los cuales se hicieron 7 repeticiones por dos días para sacar repetibilidad y reproducibilidad.

Resultados del analito ISOAMILICO obtenidos en el Día 1 y Día 2

Observando los datos obtenidos en las corridas del cromatógrafo de gases en las unidades de mg/100mL en las concentraciones antes señaladas se generaron las siguientes tablas con lo que se procedió a realizar los siguientes cálculos.

TABLA 33: INYECCIONES REALIZADAS EN LOS DÍAS 1 Y 2 DEL ANALITO ISOAMÍLICO

BAJA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	94.24	100.66
	2	94.54	94.16
	3	93.83	94.59
	4	93.83	94.47
	5	93.37	94.50
	6	93.36	93.77
	7	92.91	92.96
MEDIA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	237.05	238.00
	2	240.12	240.62
	3	238.57	237.97
	4	238.42	238.04
	5	240.00	237.45
	6	238.15	237.20
	7	237.37	239.00
ALTA	Muestra	Día 1	Día 2
	1	786.66	794.21
	2	776.37	744.79
	3	779.14	759.73
	4	772.31	759.70
	5	748.76	759.54
	6	770.87	757.30
	7	782.39	773.99

3.7.2 ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Análisis de varianza de un factor para homogeneidad.

Análisis de varianza de un factor a concentración baja

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	7	656.0877	93.7268143	0.312026
Columna 2	7	665.1042	95.0148857	6.509307

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5.80695	1	5.80694802	1.702585	0.21641865	4.74722535
Dentro de los grupos	40.928	12	3.41066653			
Total	46.7349	13				

3.7.2.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	94.37085
s	1.89604743
%RSD	2.00914523
sr	1.846799
si	0.58508626
spi	1.93726417
%r	1.95695916
%Pi	2.05282051

Análisis de varianza de un factor a concentración media

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	7	1669.67	238.524	1.393966
Columna 2	7	1668.27	238.325	1.348496

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.13874	1	0.13874	0.101176	0.75589	4.747225
Dentro de los grupos	16.4548	12	1.37123			
Total	16.5935	13				

3.7.2.2 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
---------------	-------------------

$\bar{x}$	238.4245
s	1.1298
%RSD	0.4739
sr	1.1710
si	0.4196
spi	1.2439
%r	0.4911
%Pi	0.5217

Análisis de varianza de un factor a concentración alta

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	5416.49	773.785	152.0264
Columna 2	7	5349.26	764.18	247.083

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	322.88	1	322.88	1.618001	0.227469	4.747225
Dentro de los grupos	2394.66	12	199.555			
Total	2717.54	13				

3.7.2.3 CRITERIO DE ACEPTACIÓN: F CALCULADA > F TABLAS CON UNA PROBABILIDAD MAYOR A 0.05

Prueba	Resultados
$\bar{x}$	768.9822
s	14.4583
%RSD	1.8802
sr	14.1264
si	4.1974
spi	14.7368
%r	1.8370
%Pi	1.9164

Criterio de aceptación:

% r < 5 %

% Pi < 15 %

3.7.2.4 ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN

Datos: Se analizaron 10 muestras de una solución con valor conocido

No. de muestras	Recuperación
1	97.9893725
2	95.5549121
3	101.610405
4	101.139718
5	98.258966
6	99.847565
7	100.679909
8	101.725646
9	98.73519
10	100.363545
promedio	99.5905229
s	1.95059974

Criterio de aceptación: el valor promedio debe estar entre el 98 % – 102 %

3.7.2.5 ANÁLISIS DE SESGO

Datos: De los resultados de recuperación de determina el intervalo de confianza a menos 2 grados de libertad con un 99.75 % de confianza

Intervalo de confianza +	101.207861
Intervalo de confianza -	97.9731847

Criterio de aceptación: el valor de 100 % debe estar incluido

3.7.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Diagrama de Ishikawa

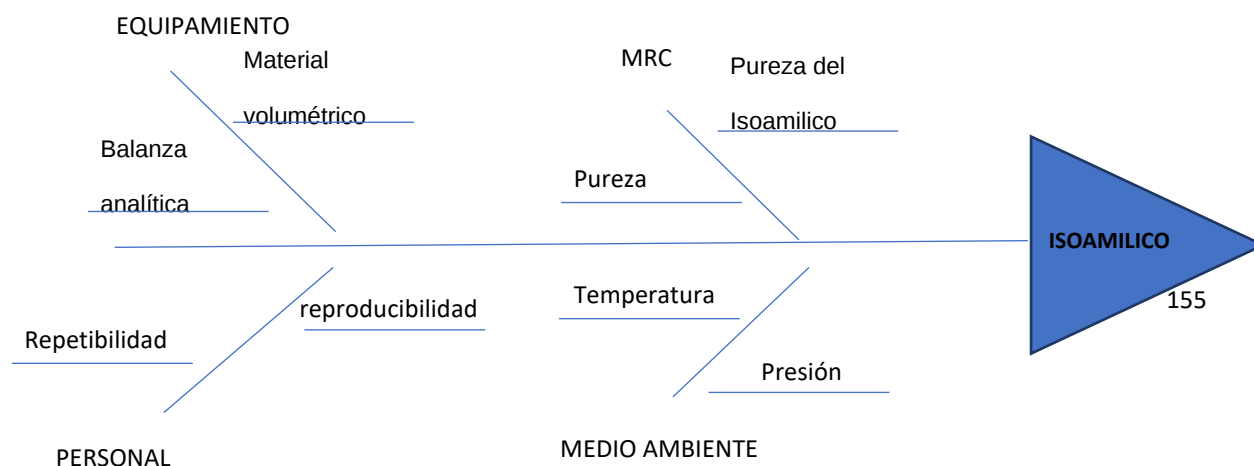


FIGURA 50: DIAGRAMA DE ISHIKAWA DEL ANALITO ISOAMÍLICO

INCERTIDUMBRE TIPO A

U_{rec}	0.61683
U_{rec-rel}	3.4579
U_{stotBAJA}	1.3203
U_{stotBAJA-rel}	15.6742

INCERTIDUMBRE TIPO B

U _{material}	
U_{vpp1ml}	0.001143
U_{vpp2ml}	0.000490
U_{vpp4ml}	0.003511
U_{vpp6ml}	0.002245
U_{vmatraz1}	0.022422
U_{vmatraz2}	0.021402
U_{vmatraz3}	0.015385
U_{vMatraz4}	0.017497
U_{vMatraz5}	0.012129
U_{vMICROPIPETA 0.1}	0.200042
U_{vMICROPIPETA 0.5}	0.420496
U_{vMICROPIPETA 1}	0.089815
U _{equipos}	
U_{eq10}	0.000034
U_{eq100}	0.000085
U_{eqBalanza}	0.000075
UMRC	0.288675

Incertidumbre combinanada	16.12671893
Incertidumbre exp. K=2	32.25343786

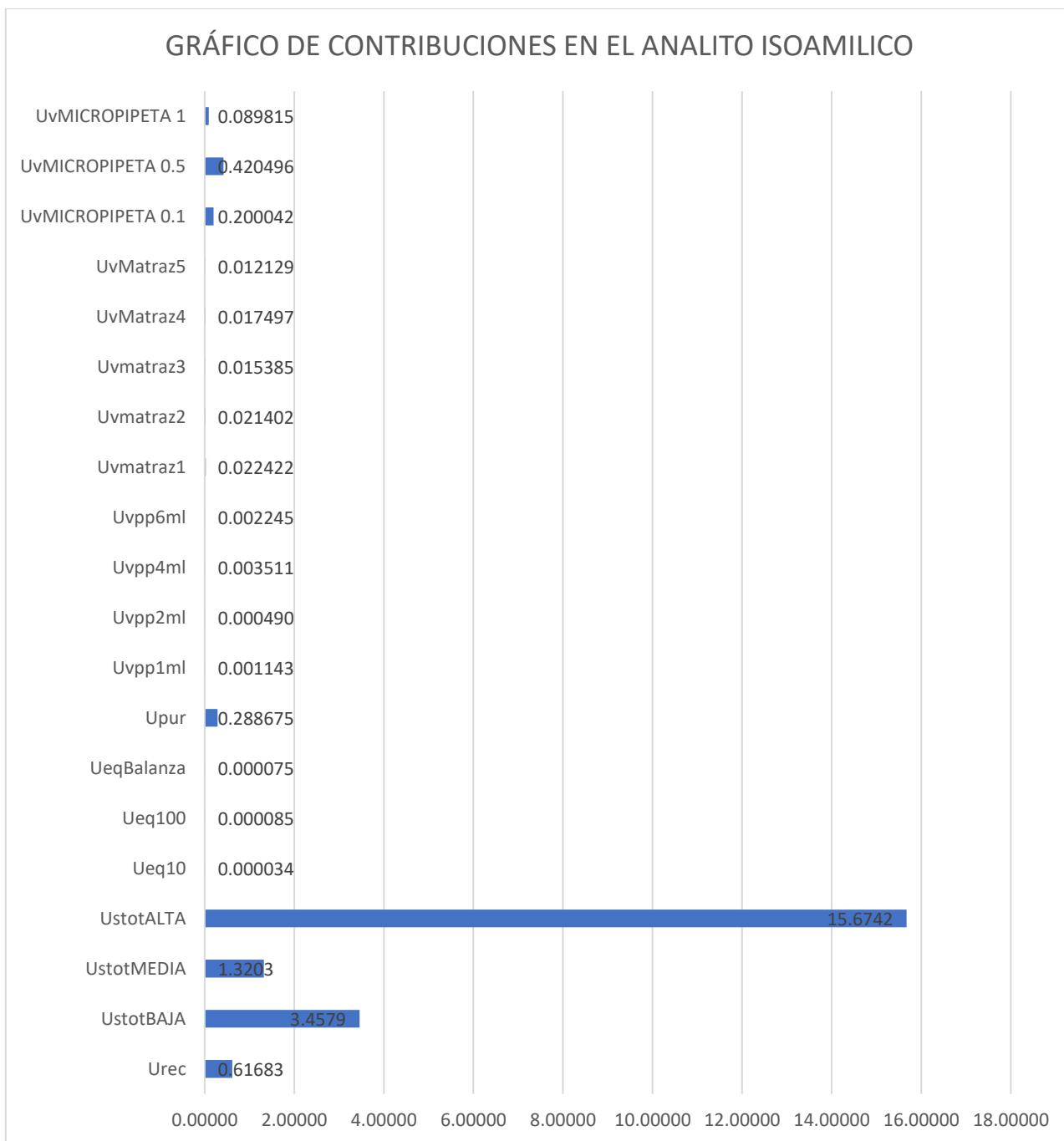


FIGURA 51: GRÁFICO DE CONCENTRACIÓN DEL ANALITO ISOAMÍLICO

CONCLUSIÓN

El estandarizar los parámetros para la validación de un método analítico que permita la cuantificación tanto de metanol y alcoholes superiores haciendo uso de la cromatografía de gases es de suma importancia, debido a que de esta forma el Laboratorio de Calidad del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), tendrá la oportunidad y capacidad de brindar un servicio competente que le acceda a equipararse a las necesidades del mercado actual para la competitividad ante los laboratorios que realizan también este servicio en el estado de Oaxaca los cuales solo son dos, así dando también resultados confiables y sobre todo que cumplan con los requisitos que exigen las Normas Oficiales Mexicanas y las Normas estudiada la cual es la ISO-17025 principalmente los enfocados en la NMX-V-005-NORMEX-2018

Con lo se da por entendido que al cuantificar la concentración del metanol y los alcoholes superiores presentes en los resultados de las inyecciones generadas durante el proyecto, los valores se encuentran dentro del rango permisible y por lo tanto es aceptable para el equipo del Laboratorio de Calidad del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) y en base con lo anterior queda demostrado que la fiabilidad de los resultados es lo que señala la norma dentro de sus estatutos “NMX-V-005-NORMEX-2018” que en las muestras y por el método de cromatografía de gases en el estado de Oaxaca, nos permite tener un control eficiente dentro de los productos a analizar en el estado, como sus colindantes, permitiendo así la eficiencia del laboratorio y optimizando la competitividad debido a la limitante de laboratorios certificados ante la Entidad Mexicana de Acreditación EMA en el Estado, con la finalidad de permitirle al Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) optimizar y brindar un servicio más completo y ayudando así a una regulación de los precios establecidos por parte de dichos laboratorios.

Con base en los parámetros a desempeñar para la validación de un método, en cada analito se obtuvieron los datos señalados en las tablas y gráficos de resultados con

valores permisibles, los cuales están dentro de los parámetros de la norma, con lo que los valores a calcular, la linealidad, el intervalo de trabajo, el límite de cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia, la recuperación, el sesgo y la incertidumbre, con lo que realizó y calculó la curva de calibración para el estudio de las muestras futuras que se llegaran a realizar por parte del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), con el fin de obtener un beneficio a sus servicios ya brindados como son trazabilidad del producto, dictamen, recolección, análisis, seguimiento a producción, revisión de etiquetado, tramites de denominación de origen, además de la agilización de los resultados para los socios.

La validación de métodos analíticos dentro de la industria química, es importante en los laboratorios, tanto de servicios privados como en los de investigación, con lo cual se asegura la fiabilidad de sus resultados, mismos que son utilizados en la toma de decisiones dentro de los procesos de producción en la rama de ingeniería química para cumplir con los parámetros los cuales están establecidos en las normas a utilizar.

BIBLIOGRAFÍA

- Bautista, C. G. (2000). Nota Histórica sobre los usos del Agave . Centro de Unvestigaciones Históricas Pedro Manuel Arcaya.
- Biólogos, C. N. (2002).
- Carrau, F. M. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 243, 107-115.
- CASTELLUCCI, F. (2015). *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.* . Organisation internationale de la vigne et du vin.
- Crubellati R., [. (2009). *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas.* Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Diario Oficial de la Federación . (2014). *NOM-142-SSA1/SCFI-2014.* México: Secretaría de Economía .
- Diario Oficial de la Federación. (2017). *Norma Oficial Mexicana-199-SCFI-2017.* México: Secretaría de Economía .
- Diario Oficial de la Federal de México. (2016). *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016: Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.* México, México.
- Diario Oficial de la Federeación,. (2017). *Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.* México: Secretaría de Economía.
- Diario Oficial de laFederación. (2017). *ISO/IEC-17025.* México: Secretaría de Economía.
- Díaz, M. (2000). Agave cocui. *Fundacite Falcón*, 24.
- Dufour, M. G. (2001). tequilas: Charm Analysis of Blanco, Reposado, and Añejo tequilas . *ACS Symposium Series* , 63-72.

- Eduardo, P. Y. (1996). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. reverté.
- Enciclopedia Encarta Microsoft. (2000). Estados Unidos: Microsoft Corporation.
- Enciclopedia Larousse Tomo I*. (1999). Barcelona: Larouse .
- Estévez, R. (2014). *Manual Tecnológico Industria Alcohólica Cubana*. La Habana, Cuba: Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- Ferreira, V. O. (2002). *Chemical characterization of the aroma of grenache rosé wines. Aroma Extract Dilution Analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies*.
- Food and Drugs Administration. (2000). Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. . *Center for Drug Evaluation and Research*.
- García-Mendoza, A. (2002). Distribution of the genus Agave (Agavaceae) and its endemic species in Mexico. *Cactus and Succulent Journal (US)*, 177-187.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona press.
- Gilman, G. (2000). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
- HARRIS, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. Iberoamérica.
- Hernández, N. (25 de Abril de 2012). *Biocombustible y otras Fuentes de Energía*. *Jornadas Nacionales* . Obtenido de http://acading.org.ve/info/comunicacion/pubdocs/CIV/energia/6_Biocombustibles_y_otras_fuentes_de_energia_pdf
- Katzung, B. (2000). *Farmacología Básica y Clínica*. México: El Manual Moderno.

- L., S. (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.*
- M, R. R. (s.f.). *Obtención de metanol propiedades usos.* Buenos Aires: universidad tecnológica nacional Buenos Aires Argentina.
- MAROTO, A. (2002). *Incertidumbre en métodos analíticos de rutina.* Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica.
- Monteiro, M. G. (2007). *Alcohol y salud pública en las Américas: un caso para la acción.* Obtenido de www.paho.org/spanish/dd/pin/A&SP.pdf
- Morrison, B. (1990). *Química orgánica.* Wesley Iberoamericana.
- Nobel, P. (1988). *Environmental Biology of Agaves and Cacti.* Cambridge University Press.
- Peña-Alvarez., A. L. (2004). Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A*,, 131-136.
- Rahway, M. C. (1983). *The Merck Index.*
- Raymond, C. (1998). *Química.* McGraw Hill.
- Riesgo Químico - Accidentes Graves Metanol Región de Murcia Consejería de Sanidad Dirección General de Salud Pública Servicio de Sanidad Ambiental.* (2007). Obtenido de Riesgo Químico - Accidentes Graves Metanol Región de Murcia Consejería de Sanidad Dirección General de Salud Pública Servicio de Sanidad Ambiental: www.murciasalud.es/archivo.php?id=99967
- Sanchez-Arreguin, J. A. (2005). *Implementación de la Cromatografía de Gases y Espectrofotometría de Masas para el análisis del proceso de mezcal .* Celaya: Instituto Tecnológico de Celaya.

SKOOG, D. A., & WEST, D. M. (2005). *Fundamentos de Química analítica*. International Thomson.

Skoog, H. N. (2001). *Principios de análisis instrumental*. España: Mc Graw Hill.

Tešević, V. N. (2005). Volatile Components from Old Plum. *Food Technology and Biotechnology*, 367–372.

Uribe, C. (1989). *Manual de Toxicología Clínica*. temis.

Valcarcel M, G. A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Reverté S.A.

Ward, L. A. (s.f.). *ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO*. Ginebra: industria de las bebidas.