

VALIDACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS EN EL LABORATORIO DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO Y COBRE EN MUESTRAS DE RON PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA LICORERA DE CALDAS POR LA TECNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN LLAMA.

Diana Constanza Puerta Jaramillo
María Victoria Restrepo Marín

Anteproyecto de grado, requisito parcial para optar al título de:
Tecnóloga Química

Director: Ariel Felipe Arcila Zambrano
Químico Industrial

ESCUELA DE QUÍMICA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
PEREIRA
2011

AGRADECIMIENTOS

- A nuestros padres porque sin su apoyo y perseverancia no hubiésemos podido alcanzar todos los objetivos trazados.
- Al profesor Felipe Arcila Zambrano por su enorme paciencia y por sus palabras de aliento en momentos de desesperación.
- A la Industria Licorera de Caldas por proporcionarnos todas las muestras para llevar a cabo el proyecto.
- A la escuela de química y al laboratorio de análisis Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira por brindarnos y facilitarnos los materiales y reactivos para poder desarrollar satisfactoriamente nuestro trabajo de grado, el cual nos permite culminar una etapa muy importante tanto en nuestras vidas como en nuestra profesión.

CONTENIDO

1. Formulación del problema	7
2. Justificación	8
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4. Marco de referencia	11
4.1 Bebidas espirituosas.....	11
4.2 Ron.....	12
4.3 Aguardiente.....	16
4.4 Metales en bebidas alcohólicas.....	18
4.5 Espectrometría de absorción atómica.....	19
4.5.1 Absorción.....	19
4.5.2 Ley de Beer- Lambert.....	20
4.5.3 Instrumentación.....	21
4.5.3.1 Fuente de radiación.....	21
4.5.3.2 Atomizador.....	22
4.5.3.3 Monocromador.....	24
4.5.3.4 Detector.....	24
4.5.4 Interferencias.....	25
4.6 Calidad.....	25
4.7 ¿Qué es validación?	26
4.7.1 Aspectos de medición.....	28

5. Marco legal.....	31
6. Metodología.....	32
6.1 Preparación de soluciones madre de Fe y Cu.....	32
6.2 Validación.....	32
6.2.1 Fase I.....	32
6.2.1.1 Digestión acida.....	32
6.2.1.2 Calcinación.....	33
6.2.2 Fase II.....	34
6.2.2.1 Materiales y equipos.....	34
6.2.2.2 Preparación patrones curva calibración.....	34
6.2.2.3 Preparación patrones para validación.....	36
6.2.2.4 Preparación de muestras.....	36
6.2.3 Fase III.....	38
6.2.3.1 Análisis de Fe.....	38
6.2.3.2 Análisis de Cu.....	43
6.3 Método de comparación.....	51
6.3.1 Fase I.....	51
6.3.2 Fase II.....	51
6.3.2.1 Materiales y equipos.....	52
6.3.2.2 Preparación patrones curva calibración.....	52
6.3.2.3 Preparación de muestras de aguardiente.....	53
6.3.3 Fase III.....	55
6.3.3.1 Análisis de Fe.....	55
6.3.3.2 Análisis de Cu.....	59
6.4 Verificación de las metodologías.....	66
6.4.1 Lecturas de Fe.....	67
6.4.2 Lecturas de Cu.....	68

7. Conclusiones	71
8. Recomendaciones.....	72
9. Bibliografía	73
10. Anexos.....	74

CONTENIDO DE TABLAS

TABLA 1. Propiedades de la llama.....	23
TABLA 2. Lecturas previas utilizando digestión acida y calculando % R.....	33
TABLA 3. Lecturas previas utilizando calcinación y calculando %R.....	33
TABLA 4. Patrones de Hierro en ron.....	34
TABLA 5. Patrones de Cobre en ron.....	35
TABLA 6 .Patrones para validación de Hierro.....	36
TABLA 7 Patrones para validación de Cobre.....	36
TABLA 8. Muestras adicionadas de Fe en ron.....	37
TABLA 9. Muestras adicionadas de Cu ron.....	37
TABLA 10. Estadísticos determinados a los patrones de Fe en ron.....	38
TABLA 11. Coeficiente variación patrones de Fe en ron.....	39
TABLA 12. Determinación del error relativo de patrones de Fe en ron.....	39
TABLA 13. Porcentaje recuperación lecturas de Fe en ron.....	40
TABLA 14. Estadísticos para determinar funcionamiento equipo con Fe.....	42
TABLA 15. Test Grubbs para patrones Fe ron.....	43
TABLA 16. Estadísticos determinados a patrones Cu en ron.....	43
TABLA 17. Coeficiente de variación patrones de Cu en ron.....	44
TABLA 18. Determinación de error relativo patrones de Cu en ron.....	44
TABLA 19. Porcentaje recuperación en lecturas Cu en ron.....	45
TABLA 20. Estadísticos para determinar funcionamiento de equipo con Cu....	47
TABLA 21. Test Grubbs para patrones Cu ron.....	48
TABLA 22. Comparación de metodología.....	51
TABLA 23. Patrones Fe para comparación de metodología.....	52
TABLA 24. Patrones Cu para comparación de metodologías.....	53
TABLA 25. Muestras Fe en aguardiente.....	54
TABLA 26. Muestras Cu en aguardiente.....	54
TABLA 27. Determinación estadístico para matriz aguardiente.....	55
TABLA 28. Coeficiente de variación patrones aguardiente.....	55
TABLA 29. Error relativo de patrones de Fe en aguardiente.....	56
TABLA 30. Porcentaje recuperación de muestras de Fe en aguardiente.....	56

TABLA 31. Parámetros para corroborar funcionamiento de equipo con Fe.....	58
TABLA 32. Test de Grubbs para patrones Fe en aguardiente.....	59
TABLA 33. Estadísticos determinados a los patrones Cu en aguardiente.....	59
TABLA 34. Coeficiente de variación de patrones en aguardiente.....	60
TABLA 35. Porcentaje error relativo de patrones de Cu en aguardiente.....	60
TABLA 36. Porcentaje de recuperación de muestras de Cu en aguardiente...	61
TABLA 37. Patrones para corroborar funcionamiento del equipo con Cu.....	63
TABLA 38. Test de Grubbs para patrones de Cu en aguardiente.....	64
TABLA 39. Patrones Fe para verificación.....	67
TABLA 40. Lecturas Fe en muestras de ron y aguardiente.....	67
TABLA 41. Porcentajes de error patrones de Fe para verificación.....	68
TABLA 42. % recuperación muestras adicionadas Fe en ron y aguardiente...	68
TABLA 43. Patrones de Cu para verificación.....	68
TABLA 44. Lecturas Cu en muestras de ron y aguardiente.....	69
TABLA 45. Porcentajes de error patrones de Cu para verificación.....	69
TABLA 46. % recuperación en muestras adicionadas con Cu.....	69

CONTENIDO DE FIGURAS

FIGURA 1. Algunas bebidas espirituosas.....	11
FIGURA 2. Ron viejo de Caldas.....	16
FIGURA 3. Aguardiente Cristal.....	17
FIGURA 4. Diagrama de absorción.....	20
FIGURA 5. Equipo básico de absorción atómica.....	21
FIGURA 6. Lámpara de cátodo hueco.....	21
FIGURA 7. Mechero de flujo laminar.....	22
FIGURA 8. Procesos durante atomización.....	23
FIGURA 9. Primera grafica de Fe en ron.....	41
FIGURA 10. Segunda grafica de Fe en ron.....	41
FIGURA 11. Tercera grafica de Fe en ron.....	41
FIGURA 12. Cuarta grafica de Fe en ron.....	41
FIGURA 13. Quinta grafica de Fe en ron.....	41
FIGURA 14. Sexta grafica de Fe en ron.....	41
FIGURA 15. Séptima grafica de Fe en ron.....	42
FIGURA 16. Curvas de linealidad de Fe en ron.....	42
FIGURA 17. Primera grafica de Cu en ron.....	45
FIGURA 18. Segunda grafica de Cu en ron.....	45
FIGURA 19. Tercera grafica de Cu en ron.....	46
FIGURA 20. Cuarta grafica de Cu en ron.....	46
FIGURA 21. Quinta grafica de Cu en ron.....	46

FIGURA22	Sexta grafica de Cu en ron.....	46
FIGURA23	Séptima grafica de Cu en ron.....	46
FIGURA 24.	Curvas de linealidad de Cu en ron.....	47
FIGURA 25	Primera Grafica Fe en aguardiente.....	57
FIGURA 26	Segunda Grafica Fe en aguardiente.....	57
FIGURA 27	Tercera Grafica Fe en aguardiente.....	57
FIGURA 28	Cuarta Grafica Fe en aguardiente.....	57
FIGURA 29	Quinta Grafica Fe en aguardiente.....	57
FIGURA 30.	Curvas para linealidad de Fe en aguardiente.....	58
FIGURA 31	Primera Grafica Cu en aguardiente.....	61
FIGURA 32	Segunda Grafica Cu en aguardiente.....	61
FIGURA 33	Tercera Grafica Cu en aguardiente.....	62
FIGURA 34	Cuarta Grafica Cu en aguardiente.....	62
FIGURA 35	Quinta Grafica Cu en aguardiente.....	62
FIGURA 36.	Curvas para linealidad de Cu en aguardiente.....	63
FIGURA 37.	Curvas de calibración de Fe para verificación.....	67
FIGURA 38.	Curva calibración de Cu para verificación.....	68

CONTENIDO DE ANEXOS

ANEXO 1. Norma Técnica Colombiana 278 Bebidas alcohólicas. Ron.....	75
ANEXO 2. Norma Técnica Colombiana 411 Bebidas alcohólicas. Anís o Anisado.....	78
ANEXO 3. Valores críticos T de Grubbs, para rechazo de datos.....	80
ANEXO 4. Lecturas de Fe y Cu en ron.....	81
ANEXO 5. Lecturas de Fe y Cu en aguardiente.....	86

1. FORMULACION DEL PROBLEMA

Desde finales del siglo XVII el consumo de ron ha aumentado notablemente alrededor del mundo, su popularidad es tan evidente que se han debido perfeccionar sus procesos de producción y mantener un control de calidad del mismo.

Teniendo en cuenta que un exceso de metales en las bebidas alcohólicas puede deteriorar el producto y traer potenciales riesgos para la salud del consumidor, es necesario realizar un análisis rutinario para controlar estas variables en él; variables que al ser analizadas por la técnica de absorción atómica en llama son enmascaradas por algunas componentes inherentes a la muestra las cuales pueden ser los carbohidratos, que al quemarse presentan una falsa absorción al momento de la lectura, por esto se plantea si ¿Es posible realizar una validación para la determinación de Hierro y Cobre en muestras de ron de la Industria licorera de Caldas?

2. JUSTIFICACIÓN

El ron es un licor obtenido a partir de la extracción del jugo de caña de azúcar, el cual se fermenta y posteriormente es llevado a destilación para refinar y purificar el fermentado y eliminar las impurezas; una vez terminado este proceso el producto es llevado a barricas de roble para su añejamiento.

En la Industria licorera de Caldas, el ron es elaborado con las aguas más puras ubicadas en las montañas cercanas y añejado 3, 5 y 8 años en barriles de roble colombiano a 2.500 metros sobre el nivel del mar, con un contenido alcohólico de 40% en volumen [1]

La determinación de Hierro y Cobre se realiza en muestras de ron ya que la concentración de metales en muchas bebidas alcohólicas puede ser un parámetro tanto positivo como negativo. Elevadas cantidades de estos metales pueden deteriorar la bebida y causar daños en la salud del consumidor; moderadas cantidades ayudan en la conservación del producto y pueden ser ingeridas por el consumidor como una materia esencial en la digestión. Por las anteriores razones se comparó con los valores máximos permitidos por la Norma Técnica Colombiana 278 Versión 2005 para metales en rones y por las normas establecidas dentro de la misma industria las cuales son de 0 a 3 mg/L para Cu y de 0 a 8 mg/L para Fe.

Es importante determinar específicamente la presencia de estos metales por varias razones:

El Hierro (Fe) es absorbido en el cuerpo con mayor rapidez que en las plantas y se necesita, pues es parte esencial en la hemoglobina, es el agente colorante que le da el color rojo a la sangre la cual transporta el oxígeno a través de nuestros cuerpos, pero si bien es un importante suplemento para el organismo, un exceso conduce a dos enfermedades: la hemosiderosis (exceso de depósito en el hígado y bazo) y hemocromatosis (exceso de Hierro en los tejidos corporales). [2]

En el ron, el hierro puede ser adquirido por tuberías galvanizadas presentes en el proceso de producción de la bebida alcohólica, las cuales pueden liberar óxidos de este metal y contaminar el producto final.

El Cobre (Cu) en contacto prolongado con los seres humanos puede llegar a producir gripe conocida como fiebre del metal, esta fiebre pasara después de dos días y es causado por una sobre sensibilidad; puede también irritar la nariz, boca y

ojos y causar dolor de cabeza, estomago, mareos, vómito y diarreas. Una toma grande de cobre puede causar daño al hígado y los riñones e incluso la muerte.

El cobre en el ambiente es fácilmente liberado desde fuentes naturales como por ejemplo volcanes, vegetación en descomposición e incendios forestales. Al no degradarse en el medio ambiente puede ser fácilmente adherido a partículas de materia orgánica como por ejemplo azucares y etanol, en el caso específico de las bebidas alcohólicas.

La técnica que se efectuará es la de espectroscopia de absorción atómica por llama, la cual puede detectar concentraciones muy pequeñas de los elementos a analizar; con los datos obtenidos por esta técnica se pretende validar el método analítico por medio de un análisis estadístico previamente planteado con el cual se determinara exactitud, precisión, límite de detección, cuantificación, linealidad, reproducibilidad, sensibilidad, desviación estándar y porcentaje de recuperación. [3,4]

La validación es el proceso documentado por el cual se verifica la veracidad de un método y su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos; un buen resultado de esta, trae consigo la mejora en la calidad del método, optimización de procesos y reducción de costos. [5]

Validar el método para el laboratorio de análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira aporta beneficios como una mayor credibilidad y confiabilidad en el servicio de calidad del mismo, además por medio del análisis que se realiza se busca verificar la calidad de los rones y aguardientes de la Licorera de Caldas los cuales se acreditan por las NTC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Validar las metodologías en el laboratorio de análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira para la determinación de Hierro y Cobre en muestras de ron provenientes de la Industria Licorera de Caldas, por medio de la técnica de absorción atómica de llama.

3.2 Objetivos específicos

- Analizar la concentración de metales en muestras de ron y aguardiente, compararlas con los parámetros establecidos en la Norma Técnica Colombiana Número 278 y 411 versión 2005 y los parámetros establecidos dentro de la Industria Licorera de Caldas
- Determinar las interferencias en el método para la determinación de Fe y Cu en las muestras de ron viejo de Caldas.
- Establecer el mejor método para la determinación de Fe y Cu en muestras de aguardiente.
- Validar la determinación de Hierro y Cobre a través de los estadísticos: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite cuantificación y porcentaje de recuperación.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 Bebidas espirituosas

Se considera bebidas espirituosas a aquellas bebidas con contenido alcohólico procedentes de la destilación de materias primas agrícolas (uva, cereales, frutos secos, remolacha, caña, fruta, etc.). Se trata, así, de productos como el brandy, el whisky, el ron, la ginebra, el vodka, entre otros.

La definición técnica y legal de bebida espirituosa según el Reglamento CE 110/2008 (art. 1) del parlamento Europeo, en cuya virtud se entiende básicamente por bebida espirituosa la bebida alcohólica destinada al consumo humano, con cualidades organolépticos particulares, con una graduación mínima de 15%vol , obtenida por destilación, en presencia o no de aromas, de productos naturales fermentados, o por maceración de sustancias vegetales, con adición o no de aromas, azúcares, otros edulcorantes, u otros productos agrícolas.

El proceso de destilación no sólo concentra el alcohol, sino que elimina una gran cantidad de impurezas de sabor desagradable. Luego, durante el proceso de envejecimiento, que por lo general tiene lugar en barriles de madera quemada, las impurezas, que son sobre todo una mezcla de alcoholes superiores, se oxidan parcialmente a ácidos, que reaccionan con los alcoholes remanentes formando esterres de sabor agradable. Algunos ejemplos de estas bebidas, se presentan a continuación [6]:

	RON Bebida espirituosa obtenida exclusivamente por fermentación alcohólica y destilación, bien de melazas o de jarabes procedentes de la fabricación de caña de azúcar.
	WHISKY Bebida espirituosa obtenida por la destilación de mosto de cereales, sacarificado por la diastasa de malta, fermentado bajo la acción de la levadura, destilado a menos de 94,5% vol y envejecido al menos durante tres años en toneles de madera.
	ANIS Bebida espirituosa obtenida por la aromatización de un alcohol etílico con extractos naturales de anís estrellado (<i>illicumverum</i>), de anís verde (<i>pimpinella anisum</i>), de hinojo, u otra planta que contenga el mismo constituyente aromático principal.

Fig. 1. Algunas bebidas espirituosas

Las características de cada tipo de bebida se deben a las diferencias en las proporciones de los diversos compuestos, mientras que los matices que distinguen a las bebidas íntimamente relacionadas se deben a la presencia de compuestos minoritarios.

Los compuestos de aroma y sabor de las bebidas destiladas provienen de dos fuentes principales: del proceso de fermentación y de la madera de los toneles en los que se madura el destilado. [7]

El presente trabajo se centró en dos tipos de bebidas espirituosas, el ron y aguardiente (bebida anisada), con las cuales se busca validar un método para la determinación de algunos metales en las mismas.

4.2 Ron

El ron es una bebida alcohólica destilada a partir de caña de azúcar. Es una bebida conocida desde hace muchos siglos y que se ha elaborado en aquellos lugares cuyo clima permite el cultivo de la caña azucarera. Sin embargo, su producción se centra en las Indias Occidentales.

Las materias primas empleadas habitualmente en la elaboración de ron son el azúcar de caña, los jarabes (almíbar) y las melazas. El zumo de caña es lo más apropiado para la elaboración del ron suave, este zumo se fermenta directamente o bien, en la obtención de ron de mayor calidad, después de calentarlo y clarificarlo. Las melazas se emplean en la elaboración de ron con gran aroma.

En la fermentación del ron, las levaduras tienen que ser capaces de conseguir un elevado contenido de etanol y un contenido correcto en compuestos del aroma. En la producción a pequeña escala, particularmente en Jamaica, se sigue confiando en la fermentación espontánea, por lo que los rones que se obtienen son muy característicos y con mucho aroma. En los demás casos se utilizan cultivos puros de levaduras. Para los rones suaves se prefieren las cepas de fermentación rápida de *Sacch. Cerevisiae*, pero para los rones fuertes se prefiere utilizar *Schizosaccharomyces pombe*. Las melazas son la mejor fuente de levaduras y pueden contener una amplia variedad de géneros, entre los que se cuentan *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Torulopsis*.

Las bacterias ácido butíricas como *Clostridiumbutyricum*, *Cl. Pasterianum* y *Cl. Saccharobutyricum* son importantes en la producción de ácidos volátiles en el ron fuerte. Las ácido lácticas están presentes y pueden producir problemas en al bajar el pH del extracto por debajo del óptimo de 5,5- 5,8. Las bacterias ácido acéticas también están presentes, principalmente *Acetobacter*. Estas bacterias son principalmente una de las causas del deterioro de las bebidas alcohólicas, pero pueden ser beneficiosas en el ron suave, en el que el ácido acético participa en la producción y el gusto del aroma final.

Al final de la fermentación las levaduras se separan y el ron se clarifica mediante centrifugación y se pasa a las torres de destilado. Finalmente, el ron fuerte se madura en toneles de roble, los cuales normalmente son de madera quemada. Los periodos de maduración de 10-12 años son comunes y pueden llegar a ser de 15 años. Antes del embotellado se normaliza el contenido alcohólico y se ajusta el color con caramelo. En pocos casos se añaden especias, y más raramente zumos de fruta. El ron suave se madura en toneles sin quemar. Normalmente no se producen muchos cambios en la maduración por lo que los periodos suelen ser cortos. En el caso del ron incoloro (blanco), se realiza una filtración en carbón activo para eliminar cualquier pigmento y afinar el aroma.

En el ron se han identificado 497 compuestos del aroma y varían enormemente los niveles de alcoholes superiores. La composición de alcoholes superiores en el ron es básicamente la misma que en otras bebidas destiladas, aunque algunas pueden derivar de las melazas más que de la fermentación. El ron se caracteriza por un nivel muy elevado de 2-butanol, el alto nivel de alcohol se atribuye al metabolismo bacteriano, también contiene cantidades importantes de 1- propanol y así mismo una significativa concentración de 1-octen- 3-ol.

El contenido en aldehídos totales de ron varía entre 50 y 90 mg/L. El acetaldehído es el compuesto carboxílico más importante, pero los aldehídos alifáticos de cadena más larga tienen una importancia considerable en el aroma. Las cetonas que también participan en el aroma, están también presentes en niveles significativamente altos.

En el comercio mundial, los rones reciben diferentes clasificaciones, así:

Según su añejamiento

- De 18 a 36 meses: Ron Blanco, Light, Carta Plata o Silver Label.
- De 5 años: Ron Rubio, Dorado, Etiqueta de Oro.
- De 7 años: Ron Añejo.
- De 10 a más años: Ron Extra Añejo.

Por Materia Prima

- Ronos Agrícolas: Estos se producen a partir del jugo de caña. Se producen principalmente en las Antillas Francesas.
- Ronos Industriales: Se hacen a partir de derivados del jugo de la caña (melazas), generalmente productos secundarios de la producción de azúcar. La mayoría de los ronos producidos en el mundo pertenecen a esta categoría.

Por Método de Elaboración

- Ronos Destilados en Lotes: Son aquellos que se destilan en lotes y no continuamente, usando alambiques. Si provienen de la primera destilación, se llaman de “primer destilado”. Pero al nivel comercial, los que abundan son los provenientes de una segunda destilación por los que se les denomina de “segundo destilado”.
- Ronos Destilados Continuamente: Estos son los que son producidos en mayor cantidad en el mundo y se producen por destilación continúa en columnas.

Por Presentación

- Blanco: Estos son claros, secos y ligeros, aunque el contenido alcohólico es el mismo que en otros ronos. El licor que sale de las destilerías es incoloro “blanco” debido a su corto envejecimiento (a veces solamente 1 año)
- Dorado/Ámbar: Similar al blanco pero con un color ámbar más o menos intenso, debido a que normalmente tienen un período de envejecimiento (añejamiento) más prolongado que en el caso de los blancos. A veces, para acentuar el color, se le agrega caramelo y otros colorantes.
- Negro/Oscuro: Estos son ronos pesados y con mucho cuerpo. La mayoría provienen de destilados en alambiques por lo que conservan un fuerte sabor a melaza. Los principales productores de este tipo de Ron son Jamaica y Barbados.
- Con Especies/Con Sabor: En esta categoría, los ronos son mezclados con diversos extractos para darle sabor a dichos ronos. Se usan sabores tanto de frutas (naranja, limón, banana, piña, coco, etc.) como de especias (vainilla, nuez moscada, canela, etc.). Normalmente se usa Ron blanco para los sabores de frutas mientras que para sabores de especias se emplean los ronos dorados o añejos.

- Premium: Los rones “Premium” son aquellos en los que los procesos de añejamiento y mezclado han sido llevados a un punto máximo de calidad sin que se produzcan pérdidas económicas. Con frecuencia tienen fines publicitarios, casos especiales son los de aquellos rones que, por un motivo u otro, son producidos en pequeñas cantidades. Destinados para uso privado o desarrollados para ocasiones especiales. [7]

La Industria Licorera de Caldas en su producción de rones, cuenta con tres clasificaciones según su tiempo de añejamiento:

Ron viejo caldas 3 años: Es una bebida alcohólica elaborada a partir de las mieles finales de la caña de azúcar las que se depositan en grandes tanques donde se diluyen en agua y se les agrega levaduras para que mediante la fermentación se transformen en alcoholes. El Ron Viejo de Caldas es uno de los pocos rones nacionales que pueden certificar su añejamiento natural, con 3 años en barriles de roble para lograr ese aroma y espirituoso sabor que se impone donde se brinde.

Ron 5 años, Juan de la Cruz: Nacido de la caña de azúcar y el espíritu caribeño, el Ron Juan de la Cruz es apetecido por los catadores por esa magia que le brinda su añejamiento de 5 años de sabor extra.

Ron 8 años, Carta de oro: Es el resultado del añejamiento por 8 años en barriles de roble colombiano, de las melazas de la caña de azúcar más refinadas, destilado con las aguas más puras, provenientes directamente de las montañas de los Andes Colombianos a 6.500 pies sobre el nivel del mar. Este proceso da como resultado un ron único con un intenso color ámbar, un fino sabor y viscosidad, unos aromas profundos y armónicos para el más elegante bouquet. [1]



Fig 2. Ron viejo de Caldas

4.3 Aguardiente

Se denomina aguardiente a la bebida espirituosa anisada, azucarada o no, elaborada a partir de un destilado de macerados de anís en mezcla hidroalcohólica, normalmente se utiliza extractos naturales de anís verde (*Pimpinella anisum*), anís estrellado (*Illicium verum*) o de hinojo (*Foeniculum vulgare*). Debe emplearse agua desmineralizada y azúcar en caso que proceda, de cuya pureza dependerá la calidad del producto final.

En países mediterráneos se preparan bebidas anisadas, como son el anís escarchado en Portugal, el Sambuca Italiano, Ouzo y mastika en Grecia y el raki Turco. En Iberoamérica también se producen aguardientes de anís, siendo bastante conocidos los de Colombia, Costa Rica, Argentina y México. [8]



Fig 3. Aguardiente Cristal

Para la Industria Licorera de Caldas, el denominado aguardiente Cristal es un licor obtenido de la caña de azúcar y producido a base de alcohol extraneuro a 96 grados Celsius, al cual se le agrega agua, que brota de los manantiales del Nevado del Ruiz. El agua pura a partir de las montañas primaverales, es el secreto al elaborar esta bebida alcohólica de anís. Además de esto un anís rico en aceites de hinojo es mezclado con alcoholes cuidadosamente limpiados. Esta calidad de ingredientes concedió la medalla de plata a esta bebida en el “San Francisco World Spirits Competition”. Este licor posee un contenido alcohólico del 30 % [1]

4.4 Metales en bebidas alcohólicas

Las propiedades organolépticas de las bebidas destiladas dependen de sus componentes orgánicos e inorgánicos. La determinación cuantitativa de estos compuestos es de gran importancia desde el punto analítico y tecnológico, tanto para realizar el control de calidad del producto elaborado como por su posible interés nutricional y toxicológico.

La presencia de metales puede tener distintos orígenes, puede deberse tanto a factores naturales como exógenos. Los naturales se relacionan con la variedad del cultivo, clima y composición del suelo. Por otro lado, los factores exógenos se relacionan con el uso de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, procesos de elaboración, fermentación, corrosión de equipos y otras fuentes de contaminación.

La concentración de metales en muchas bebidas alcohólicas puede ser un parámetro importante que trae efectos negativos y positivos frente al consumo y conservación del producto.

Los efectos negativos incluyen la alteración de las bebidas en sus características organolépticas, algunos metales que se han venido investigando como posible contaminantes por su fácil adherencia al producto son el Hierro y Cobre; estos minerales pueden generar turbiedades irreversibles en los licores, además grandes cantidades de Cu pueden aumentar la acidez de la bebida. También es bien sabido que pueden ser perjudiciales e incluso mortales si llegan al organismo concentraciones por encima de niveles permitidos.

Contrario a lo anterior los efectos positivos incluyen la eliminación de malos olores y sabores, una concentración clave de los metales pueden acelerar la fermentación del extracto; igualmente la ingesta moderada de algunos minerales puede ayudar en el organismo humano.

Las técnicas analíticas más utilizadas en la determinación del contenido mineral en bebidas alcohólicas son las de absorción y emisión atómica. Por el contenido orgánico que presentan las bebidas destiladas, es necesario llevar a cabo un pretratamiento de la muestra para evitar interferencias en el equipo. [2, 8, 9]

4.5 Espectrometría de Absorción Atómica

La espectrometría de absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente los metales del sistema periódico, dado que utiliza la absorción de la luz para medir la longitud de onda específica de cada átomo.

La sensibilidad de la técnica permite identificar pequeñas concentraciones de cada metal, desde partes por millón (ppm) a partes por billón (ppb).

Todas las especies cuentan con un estado de baja energía al cual se le denomina estado fundamental y un estado excitado con alta energía.

Al átomo no excitado le es necesario absorber energías externas para pasar a un nivel más alto.

La energía requerida para esta transición puede ser suministrada por un fotón de luz con una energía dada por:

$$E = h \nu$$

Donde h = constante de Planck

ν = es la frecuencia

Esto corresponde a una longitud de onda (λ) de:

$$\lambda = \frac{hc}{E}$$

Donde c es la velocidad de la luz en vacío.

4.5.1 Absorción

En teoría atómica cuántica se postula la existencia, en el interior del átomo, de un núcleo formado por protones de carga positiva y neutrones o partículas eléctricamente neutras, en torno al cual se mueven los electrones o cargas elementales negativas en diversos orbitales o niveles de energía. Así, el método de absorción atómica se basa en la diferente capacidad de absorción de radiación

de los átomos de los distintos elementos en estado fundamental, en presencia de átomos excitados del mismo tipo. Se llama estado fundamental de un átomo a una disposición de los electrones en sus órbitas de mínima energía, que son las más

próximas al núcleo atómico; un átomo excitado, por el contrario, posee electrones que ocupan las órbitas más alejadas y dejan vacías algunas de las interiores. Cuando un átomo recibe una radiación electromagnética (luz visible, infrarroja, rayos X, etc.) de la frecuencia o longitud de onda adecuada, absorbe un fotón, que es un cuanto o cantidad mínima e indivisible de energía electromagnética, y pasa a un estado excitado al transferir uno de sus electrones interiores a una órbita más alejada.

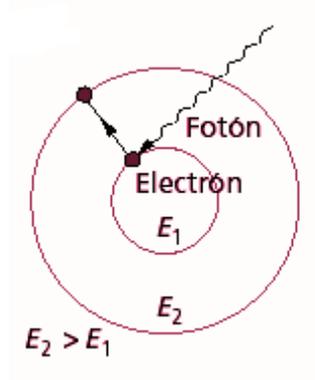


Fig 4. Diagrama de absorción

4.5.2 Ley de Beer – Lambert

La absorción que ocurre en un sistema de la absorción atómica sigue la ley de Beer- Lambert, así:

$$A = a b c$$

Donde a=constante de proporcionalidad llamada absortividad.

b= espesor de la celda

c= Concentración g/L

Cuando se expresa la concentración en moles por litro la absortividad se denomina *absortividad molar* y se representa con el símbolo ϵ . En consecuencia cuando b se expresa en centímetros y c en moles por litro.

$$A = \epsilon b c$$

4.5.3 Instrumentación

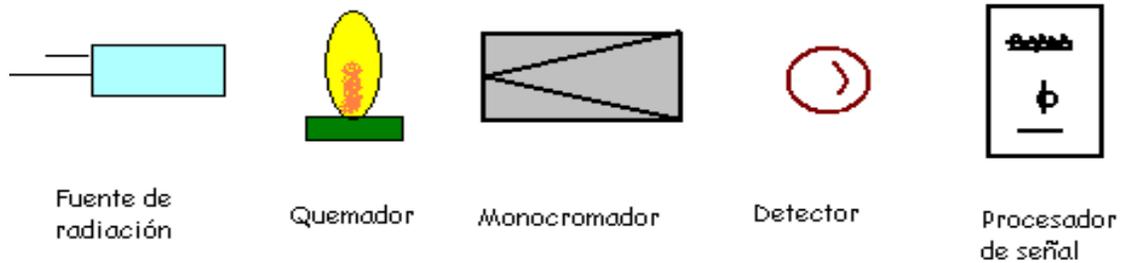


Fig 5. Equipo básico de Absorción atómica

4.5.3.1 Fuente de radiación

Los métodos de absorción atómica son potencialmente muy específicos, ya que las líneas de absorción atómica son considerablemente estrechas (0,002 a 0,005 nm), esta limitada anchura de la línea crea problemas ya que para que se cumpla la relación lineal entre la absorbancia del analito y su concentración (ley de Beer) es necesario que el ancho de banda de la fuente sea más estrecha que el ancho del pico de absorción.

El problema creado por el ancho reducido de las líneas de absorción atómicas se resuelve utilizando fuentes de líneas con anchos de banda aún más estrechos que los picos de absorción. Esto hace necesario que la técnica utilice una lámpara distinta para cada elemento.

Esta técnica utiliza generalmente la lámpara de cátodo hueco como fuente de energía externa. En el interior de la lámpara se encuentra un ánodo de Wolframio y un cátodo cilíndrico construido con el metal cuyo espectro se desea obtener, sellado herméticamente con un tubo de vidrio lleno de neón o argón a una presión de 1 a 5 torr. Cuando un alto voltaje se aplica a través del ánodo y el cátodo, los átomos de metal en el cátodo se excitan y producen luz con una determinada longitud de onda.

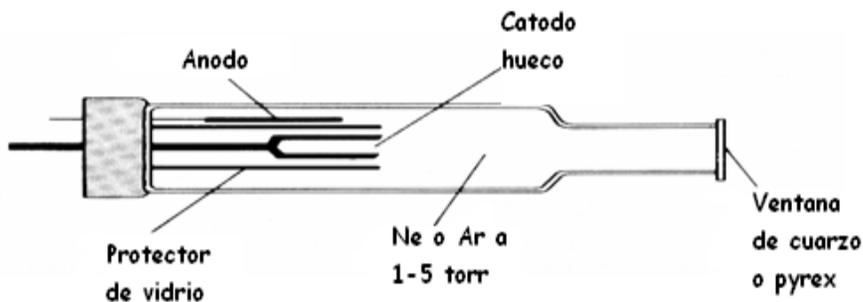


Fig 6. Lámpara de cátodo hueco

4.5.3.2 Atomizador

Los atomizadores son quemadores que permiten la separación de las moléculas para formar átomos libres por medio de un gas combustible.

El atomizador más utilizado para la absorción atómica es el atomizador de llama, el cual es un típico mechero de flujo laminar que emplea un nebulizador de tubo concéntrico, en donde la muestra se vuelve niebla y mezclada con un flujo de gas oxidante y un combustible pasan por una serie de deflectores que eliminan las gotas no muy finas a un contenedor de desechos y las finamente divididas las deja pasar a un mechero provisto de una ranura que produce una llama relativamente estable y larga, propiedades que aumentan la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica.

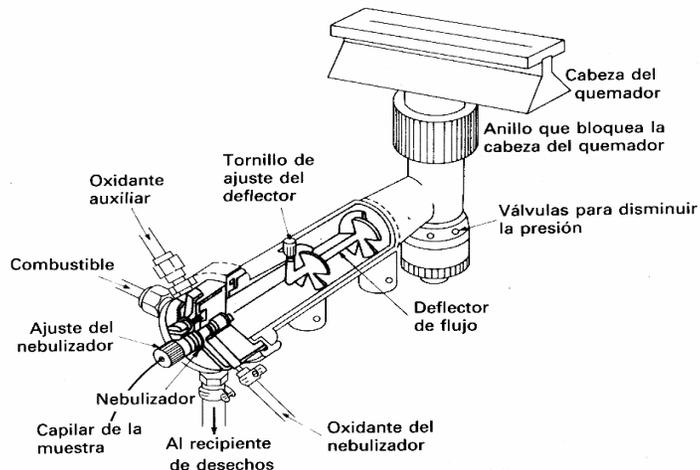


Fig 7. Mechero de flujo laminar

Mientras la muestra permanece dentro del atomizador, se da lugar a diferentes procesos los cuales se muestran a continuación.

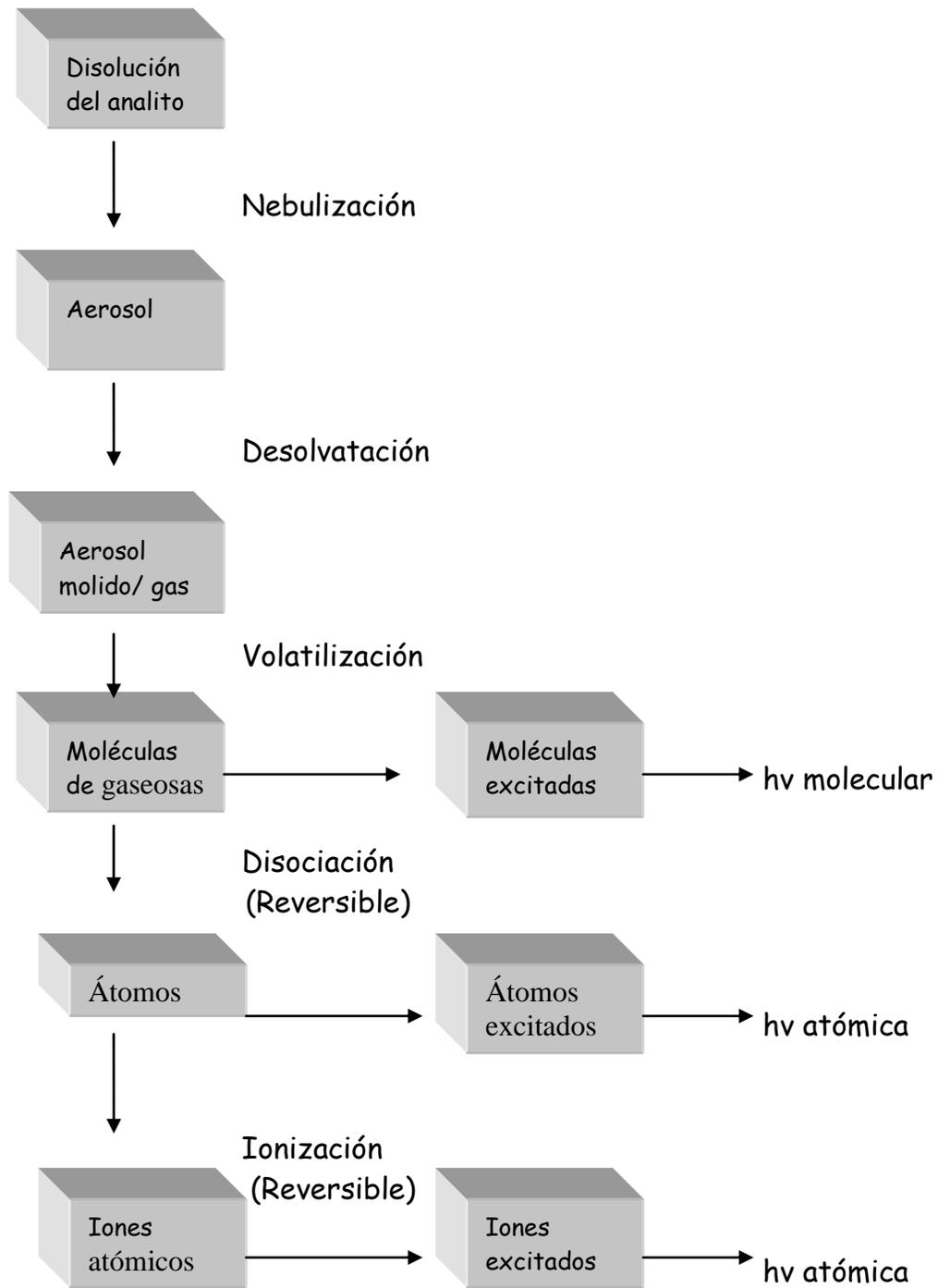


Fig 8. Algunos procesos durante la atomización

Para la llama, se utilizan como gases de combustión el propano, Hidrogeno y el Acetileno, el aire, óxido nitroso y oxígeno son utilizados como oxidantes.

Combustible	Oxidante	Temperatura °C	Velocidad de combustión (cm s ⁻¹)
Gas natural	Aire	1700- 1900	39-43
Gas natural	Oxigeno	2700- 2800	370- 390
Hidrogeno	Aire	2000- 2100	300- 440
Hidrogeno	Oxigeno	2550- 2700	900- 1400
Acetileno	Aire	2100- 2400	158- 266
Acetileno	Oxigeno	3050- 3150	1100- 2480
Acetileno	Oxido nitroso	2600- 2800	285

Tabla 1. Propiedades de la llama

4.5.3.3 Monocromador

En general, dispone de una rendija o ranura de entrada que limita la radiación lumínica producida por la fuente y la confina en un área determinada, un conjunto de espejos para pasar la luz a través del sistema óptico, un elemento para separar las longitudes de onda de la radiación lumínica, que puede ser un prisma o una rejilla de difracción, y una rendija de salida para seleccionar la longitud de onda con la cual se desea iluminar la muestra. El monocromador elimina las radiaciones interferentes y parte de la radiación no absorbida es dirigida hacia el detector.

4.5.3.4 Detector

El sistema de detección puede estar diseñado con fotoceldas, fototubos, fotodiodos o fotomultiplicadores. Esto depende de los rangos de longitud de onda, de la sensibilidad y de la velocidad de respuesta requeridas. El sistema de detección recibe la energía lumínica proveniente de la muestra y la convierte en una señal eléctrica proporcional a la energía recibida. La señal eléctrica puede ser procesada y amplificada, para que pueda interpretarse a través del sistema de lectura que una vez procesada es presentada al analista de diferentes maneras (por ejemplo, unidades de absorbancia).

4.5.4 Interferencias

Se llaman interferencias a la influencia que ejerce uno o más elementos presentes en la muestra sobre el elemento que se pretende analizar. La clasificación de los distintos tipos de interferencias se muestra a continuación:

- Interferencias físicas: Efectos causados por las propiedades físicas de la muestra en disolución.
- Interferencias espectrales: Se producen cuando la absorción de una especie interferente se solapa o aparece muy próxima a la absorción del analito, lo cual hace que su resolución por el monocromador resulte imposible. Estas interferencias se dan también debido a la presencia de productos de combustión, que poseen bandas de absorción anchas, o en forma de partículas, que dispersan la radiación. Ambos dan lugar a errores positivos, ya que disminuyen el haz de luz.
- Interferencias químicas: Son más comunes que las espectrales, se presentan cuando la muestra reacciona con otra especie química, afectando la absorción. Frecuentemente sus efectos pueden minimizarse escogiendo las condiciones de trabajo adecuadas. Existen en la actualidad evidencias de que en la llama se desarrollan procesos que están próximos al equilibrio termodinámico, los de mayor interés a la hora caracterizar las interferencias son los equilibrios de disociación, ionización y formación de compuestos poco volátiles.
- Interferencia por efecto de matriz: Estas interferencias se pueden presentar en algunas muestras que contienen especies orgánicas o cuando se utilizan disolventes orgánicos para disolver la muestra. En este caso la combustión incompleta de la matriz orgánica deja sustancias carbonosas que son capaces de dispersar la luz. [10,11,12]

4.6 Calidad

En la actualidad, la constante carrera por conquistar clientes genera un ambiente de competencia cada día más fuerte y la única vía para sobrevivir en ese medio es concebir productos de mayor calidad. Es por eso que no existe asunto más importante en los negocios de hoy que ofrecer bienes y servicios de la más alta calidad.

Por lo tanto se hace imprescindible definir que se comprende por calidad. Para comenzar se analizan las definiciones de calidad promulgadas por algunos de los gurús de la calidad:

- Phil Crosby (Crosby, 1979) calidad es: Ajustarse a las especificaciones o conformidad de unos requisitos.
- W. E. Deming (Deming, 1982) es: El grado perceptible de uniformidad y fiabilidad a bajo costo y adecuado a las necesidades del cliente.
- Joseph Jurán Jurán,(1993) define calidad como: Adecuado para el uso, satisfaciendo las necesidades del cliente.

Algunas instituciones también han definido el término calidad, a continuación se relacionan algunos ejemplos de las mismas:

- La familia de normas ISO (ISO 9000:2000) lo define como el grado en que un conjunto de características inherentes cumple con unos requisitos.
- La Real academia Española define la calidad como: “Propiedad o conjunto de propiedades inherentes a una cosa que permite apreciarla como igual, peor o mejor que las restantes de su especie.”
- La Sociedad Americana para el Control de Calidad (A.S.Q.C.) la define como: “Conjunto de características de un producto, servicio o proceso que le confieren su aptitud para satisfacer las necesidades del usuario o cliente”. [13]

En los laboratorios de control de calidad es de gran importancia ir en busca de nuevas metodologías y así mismo mantener una continua supervisión de los métodos ya establecidos, buscando en el cliente un mayor nivel de confianza y el buen reconocimiento del mismo laboratorio. Por esto es adecuado mantener los procedimientos en constante validación y mejora.

4.7 ¿Qué es validación?

La validación de un método analítico es un requisito importante en las prácticas de laboratorios de análisis químico, promoviéndole al mismo un buen sistema de gestión de calidad. Para tal fin, muchos laboratorios de la región, se rigen por la Norma ISO/IEC 17025:2006 “Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”

Millones de mediciones analíticas se realizan diariamente en miles de laboratorios alrededor del mundo, con innumerables razones para realizarlas, por ejemplo: una forma de evaluar bienes para propósitos de comercio y como apoyo a la salud. Virtualmente, cada aspecto de la sociedad está apoyado de algún modo por mediciones analíticas.

La validación de un método consiste en verificar mediante exámenes y provisión de evidencias objetivas que se cumplen unos requisitos previamente establecidos. Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico. Por ejemplo:

- Un nuevo método desarrollado para un problema específico.
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar un método a diferentes laboratorios, instrumentación, operadores y circunstancias en las cuales el método va a ser utilizado. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados. [3, 4,12]

El método establecido debe ser sometido a ensayos y muestras particularmente diseñados, con el fin de identificar los puntos débiles y ajustarlos. A continuación se establecen las características de tales muestras:

- **Patrones**
Preparados en el laboratorio y por lo menos un patrón externo certificado. La concentración de estos patrones deberá estar dentro del rango de aplicación del método. Estos son utilizados para realizar una representación gráfica de la señal, conocida como curva de calibración.
- **Blanco**
Sistema físico que no contiene el analito de interés pero si todos los demás reactivos utilizados en el método de análisis, deberá ser sometida a las mismas condiciones y el mismo procedimiento que las muestras reales.

- **Muestra**
El término se refiere a cada sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está estandarizando, ya sea un blanco, estándar, muestra adicionada o muestra real.
- **Muestra adicionada:** Es una muestra natural o real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito que se está estudiando.

El grupo básico de muestras a analizar en la validación son:

- $\bar{u}B_k$ (Blanco de reactivos y procedimiento)
- $\bar{u}E_b$ (Estándar de concentración baja)
- $\bar{u}E_m$ (Estándar de concentración media)
- $\bar{u}E_a$ (Estándar de concentración alta)
- $\bar{u}M_1$ (Muestra natural para efectos de la matriz real)
- $\bar{u}M_1. A.b$ (M1 adicionada con nivel bajo)
- $\bar{u}M_1 A.a$ (M1 adicionada con nivel alto)

4.7.1 Aspectos de medición

El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño que el método necesita caracterizar con el fin de ser validado. Para respaldar el método, es necesario realizar un análisis estadístico de los datos; los aspectos de medición a evaluar, son:

- **T de rechazo:** Inicialmente se debe contar con una prueba estadística que confirme los valores dispersos en la validación. El test de Grubbs es utilizado para este propósito. (Anexo. 3). Se debe contar con un nivel de confianza de 95% y n de mediciones adecuada. Se calcula:

$$T_{\max} = (\max - \text{media})/s$$

$$T_{\min} = (\min - \text{media})/s$$

Donde S= Desviación estándar.

Es importante aclarar que este test permite eliminar un máximo de dos datos por población; si la aplicación del criterio es mayor a dos datos, el método deberá repetirse.

- **Exactitud:** Grado de aproximación entre el valor obtenido experimentalmente y el valor aceptado; normalmente se expresa en términos de error. Se tendrá como referencia los patrones preparados en el laboratorio, y al menos un patrón externo certificado. La concentración de estos patrones deberá estar localizada dentro del rango de aplicación del método. La exactitud expresada como porcentaje de error se calcula por:

$$\% \text{ error} = (\text{teórico} - \text{leído}) / \text{teórico} * 100$$

- **Precisión:** Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar (s), desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV), que se calcula:

$$CV = s / X$$

Donde s = desviación estándar
X = media aritmética

- **Reproducibilidad:** Es una medida de precisión de datos, obtenidos por un mismo operador trabajando siempre bajo las mismas condiciones.
- **Linealidad:** Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento y se debe verificar si en el laboratorio se cumple el rango y tipo de linealidad que reporta el método.
- **Sensibilidad:** Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de las muestras, indicando su desviación estándar.

$$Y = mX + b$$

Donde m = pendiente de la recta

- **Recuperación:** Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para identificar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como porcentaje de recuperación (%R) y se calcula como:

$$\%R = (C_x - C_{bk}) / C_A * 100$$

Donde C_x = Concentración promedio de las determinaciones
 C_{bk} = Concentración blanco
 C_A = Concentración real adicionada

- **Límite de detección (LD):** Se define a partir de la más pequeña cantidad detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación. El límite de detección se calcula de la siguiente manera:

$$LD = \bar{X} + 3s$$

Donde: s = Desviación estándar
 \bar{X} = media del blanco

- **Límite de cuantificación (LC):** es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetitividad y veracidad. El límite de detección se calcula de la siguiente manera:

$$LD = \bar{X} + 10s$$

Donde: s = Desviación estándar
 \bar{X} = media del blanco

5. MARCO LEGAL

La Industria Licorera de Caldas dentro de su normatividad ha establecido un rango máximo de metales para sus productos terminados en los cuales nos hemos basado para dar paso a la validación; para hierro el valor máximo permitido es de 8 mg/L y para Cobre de 5 mg/L.

Se tomó también como referencia los siguientes apartados de la Norma Técnica Colombiana versión 2005, en los cuales se define el ron y aguardiente como bebidas alcohólicas y se da un rango de aceptación para hierro y cobre en las muestras a analizar. [1, 15]

NTC 278 Bebidas alcohólicas. Ron (anexo 1)

NTC 411 Bebidas alcohólicas. Anís o anisado (anexo 2)

6. METODOLOGIA

Para la realización del presente trabajo, se llevaron a cabo una serie de etapas con las cuales se pudo finalizar adecuadamente la validación del método; estas etapas son referidas a algunos manuales de estandarización y validación [4, 14] y se presentaran a continuación:

6.1 PREPARACION DE SOLUCIONES MADRE DE Fe Y Cu 10 mg/L

Las soluciones madre de 10 mg/ L para determinación de Fe y Cu se prepararon tomando 2 mL de cada patrón estándar Sharlau de 1000 mg/L y se afora 200 mL con agua desionizada.

6.2 VALIDACION

Para realizar todo el proceso concerniente a la validación, se llevaran a cabo una serie de etapas que nos permitan identificar las mejores condiciones para el tratamiento de muestras de ron de la Industria Licorera de Caldas; generando resultados verídicos los cuales puedan ser establecidos en el laboratorio como formato guía.

6.2.1 FASE I

Antes de empezar el análisis, es necesario establecer la mejor metodología para la determinación de la concentración de cada metal teniendo en cuenta que las bebidas espirituosas poseen por lo general un alto contenido de materia orgánica la cual interfieren considerablemente en los valores arrojados en cada medición. A continuación se presentan los ensayos y lecturas realizadas en el equipo de absorción atómica en llama Shimadzu AA-7000 del laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, para tal fin.

6.2.1.1 Digestión acida

Tomar 15 mL de solución madre de Fe y adicionar 2mL de HNO₃ concentrado, 2 mL de HCl (1:1) y 2 mL de H₂SO₄ concentrado. Llevar a calentamiento lento por 30 min evitando perdida de muestra. Un vez concentrada, filtrar y aforar a 100 mL con agua desionizada. La concentración final esperada deberá ser de 1.5 mg/L. Leer Fe en el equipo de absorción atómica con corriente de lámpara de 10 mA, longitud de onda 248,3 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 2,2 L/min, tipo de llama aire- C2H2, altura del quemador 9 mm.

Patrones Fe	Std		Std average		% R
	concentración	Absorbancia	concentración	absorbancia	
0 (blanco)	0,0422	-0,0079	0,0282	-0,0085	
	0,0143	-0,009			
1,5	1,4673	0,0481	1,4749	0,0484	96,45
	1,4826	0,0487			

Tabla 2. Lecturas previas utilizando digestión acida y calculando % recuperación

6.2.1.2 Método de calcinación

Tomar 15mL de solución madre de Fe, llevar a calentamiento lento hasta casi sequedad, posteriormente llevar a la mufla con una rampa de calentamiento de: 150 2h, 250 1h, 550 2h. Después de obtener la ceniza, adicionar 2mL de HCl (1:1) y 0.2 mL de HNO₃ concentrado dejando actuar los ácidos por 5 minutos, aforar el residuo a 100 mL con agua desionizada. La concentración final esperada deberá ser de 1.5 mg/L. Leer Fe en el equipo de absorción atómica con corriente de lámpara de 10 mA, longitud de onda 248,3 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 2,2 L/min, tipo de llama aire- C2H2, altura del quemador 9 mm

Patrones	Std		Std average		% R
	concentración	Absorbancia	concentración	absorbancia	
0 (blanco)	0,0372	-0,0081	0,0423	-0,0079	
	0,0473	-0,0077			
1,5	1,447	0,1326	1,4511	0,133	93,92
	1,4552	0,1334			

Tabla 3. Lecturas previas utilizando calcinación y calculando % recuperación

De las digestiones anteriores, se evidencia mediante los valores obtenidos después de cada lectura, que ambas son adecuadas en el análisis del metal; Teniendo en cuenta que los dos procedimientos arrojan buenos resultados, queda a criterio del analista decidir cuál metodología va a utilizar para dicho fin.

En el presente trabajo empleando el Cookbook del equipo, se decidió utilizar la segunda metodología (calcinación), ya que hay una disminución en los volúmenes adicionados de ácidos los cuales en algún momento podrían ser un factor de interferencia y además la incineración de la muestra, asegura una mayor eliminación de la materia orgánica.

6.2.2 FASE II

Después de analizar y seleccionar la metodología más adecuada, se procedió a la parte experimental del método, donde se prepararon patrones para curva de calibración, patrones para validación y contaminación de algunas muestras reales.

6.2.2.1 Materiales y equipos

- **Materiales**

Balones Volumétricos de 200 mL y 100 mL
Bureta de 25 mL clase A
Erlenmeyer de 250 mL
Pipeta volumétrica de 2 mL clase A
Pipeta graduada de 1 mL clase A
Embudos de tallo largo
Varillas de agitación
Crisoles de porcelana
Frasco lavador
Porta muestras equipo SHIMADZU AA-7000

- **Equipos**

Plancha de calentamiento
Mufla
Espectrofotómetro de absorción atómica SHIMADZU AA-7000
Equipo de destilación Elix 10

6.2.2.2 Preparación de curvas de calibración

- **Patrones de Fe**

Se toma el volumen necesario de la solución madre de Fe para preparar cada uno de los patrones de acuerdo a la siguiente tabla:

Patrones	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Blanco	0,0	0,0
1	0,5	5
2	1.0	10
3	1.5	15
4	2.0	20
5	3.0	30
6	5.0	50

Tabla 4. Patrones para Hierro en ron.

Posterior a ello adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), aforar a 100 mL con agua desionizada. Leer Fe en el equipo de absorción atómica con corriente de lámpara de 10 mA, longitud de onda 248,3 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 2,2 L/min, tipo de llama aire- C2H2, altura del quemador 9 mm.

- **Patrones de Cu**

Se toma el volumen necesario de la solución madre de Cu para preparar cada uno de los patrones de acuerdo a la siguiente tabla:

Patrones	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Blanco	0,0	0,0
1	0,5	5
2	1.0	10
3	1.5	15
4	2.0	20
5	3.0	30

Tabla 5. Patrones para Cobre en ron

Posterior a ello adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), aforar a 100mL con agua desionizada. Leer Cu en el equipo de absorción con corriente de lámpara de 8 mA, longitud de onda 324.8 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 1.8 L/min, tipo de llama aire-C2H2, altura del quemador 7mm.

6.2.2.3 Preparación de patrones para validación

Se toma el volumen necesario de la solución madre para preparar cada uno de los patrones de acuerdo a las siguientes tablas:

Patrón Fe	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Blanco üBk	0,0	0,0
Estándar de concentración baja üE.b (0,5 mg/l)	0.5	5
Estándar de concentración media üE.m (2.0mg/l)	2.0	20
üEa (5.0 mg/L)	5.0	50

Tabla 6. Patrones para validación de Fe

Patrón Cu	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Blanco üBk	0,0	0,0
Estándar de concentración media üE.m (2.0mg/L)	2.0	20
Estándar de concentración alta üEa (3.0 mg/L)	3.0	30

Tabla 7. Patrones para validación de Cu

Posterior a ello adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), y aforar a 100 mL con agua desionizada. Leer en el equipo de absorción atómica bajo las de condiciones dadas para cada metal.

6.2.2.4 Preparación de las muestras

Para dar cumplimiento al desarrollo de la investigación, se trabajará muestras de ron proporcionadas por la industria Licorera de Caldas, entidad interesada en el control de calidad del producto a investigar. Se utilizó el método de calcinación.

- **Muestras para Fe**

Para realizar el respectivo análisis de Hierro en la muestra, se utilizó Ron 8 años carta de oro. Se tomó el volumen necesario de solución madre según la siguiente tabla:

Patrón	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Muestra natural de ron üM1	N.A	0
Muestra de ron üM1a adicionada de concentración alta(5.0 mg/L)	5.0	50

Tabla 8. Muestras adicionadas de Fe en ron

- **Muestras para Cu**

Para realizar el respectivo análisis de Cobre en la muestra, se utilizó Ron tradicional 3 años. Para dichas muestras se tomó el volumen necesario de solución madre según la siguiente tabla:

Patrón	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Muestra natural de ron üM1	N.A	0
Muestra de ron üM1b adicionada concentración baja (1.0 mg/L)	1.0	10
Muestra de ron üM1a adicionada concentración alta (3.0 mg/L)	3.0	30
Muestra de ron adicionada (0.5 mg/L)	0.5	5
Muestra de ron adicionada (3.0 mg/L)	3.0	30

Tabla 9. Muestra adicionada de Cu en ron

Después de tomar el volumen necesario, se afora con ron hasta completar 100 mL, se somete a calentamiento lento evitando pérdida de muestra hasta casi sequedad y posterior a ello se lleva a la mufla con una rampa de calentamiento de: 150 2h, 250 1h, 550 2h, después de enfriar, se adiciona 0,2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1) y se dejan actuar los ácidos durante 5 minutos para finalmente aforar a 100 mL con agua desionizada. Se realiza la lectura de cada metal en el equipo de absorción atómica SHIMADZU A-7000 y el software Wizard bajo las condiciones dadas para cada metal.

6.2.3FASE III

Antes de iniciar las mediciones, se garantiza que el método es el adecuado y que el equipo funciona en condiciones óptimas para la lectura de las muestras.

La parte experimental consiste en la corrida de las muestras y registro de datos de ensayos realizados en 7 días alternos [anexos 4,5]. A continuación se muestran los datos obtenidos durante las lecturas y los estadísticos analizados para cada metal.

6.2.3.1 Análisis de Fe

Patrones	Media	N	Desviación estándar	Máximo	Mínimo	Nivel confianza 95%
Übk	-0,1901	14	0,0813	-0,0993	-0,3421	0,0470
Üeb (0,5 mg/L)	0,3750	12	0,0568	0,4531	0,2797	0,0361
Üem (2,0 mg/L)	1,8296	14	0,2772	2,1525	1,488	0,1601
Üea (5,0 mg/L)	4,8182	13	0,0611	4,9064	4,7229	0,0370
üM1. Ab (1,0 mg/L)	0,7827	12	0,1177	0,9606	0,6604	0,0748
üM1. Aa (5,0 mg/L)	4,6988	12	0,0404	4,791	4,6408	0,0257
üM1	0,0918	14	0,1101	0,2939	-0,0343	0,0636

Tabla 10. Estadísticos determinados a los patrones de Fe en ron

Precisión: Para determinar la precisión del método, se calcula el coeficiente de variación de los patrones y las muestras el cual debe ser un valor menor o igual a 15 para considerarse preciso.

Patrones	CV
Üeb (0,5 mg/L)	15,1438
Üem (2,0 mg/L)	15,1519
Üea (5,0 mg/L)	1,2691
üM1. Ab (1,0 mg/L)	15,0438
üM1. Aa (5,0 mg/L)	0,8600

Tabla 11. Coeficiente de variación de los patrones de Fe en ron

Exactitud: La exactitud del método se determina con los patrones de validación, calculando el porcentaje de error. (Üeb, Üem, Üea)

Lecturas Fe	Error relativo Üeb (0,5 mg/L)	Error relativo Üem (2,0 mg/L)	Error relativo Üea (5,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	44,06	7,625	-----
	44,06	5,725	5,24
Segunda lectura: 29/10/2010	-----	6,77	2,11
	-----	4,095	2,406
Tercera lectura: 03/11/2010	24,46	5,045	1,872
	23,96	6,075	2,564
Cuarta lectura: 09/12/2010	32,16	3,91	4,51
	24,08	3,005	3,682
Quinta lectura: 10/03/2011	15,04	23,33	5,542
	17,04	23,935	3,4
Sexta lectura: 10/03/2011	10,34	21,365	4,986
	9,38	20,97	3,578
Séptima lectura: 10/03/2011	28,84	24,595	2,99
	26,62	25,6	4,394
MEDIA	25,00	13,00	3,64

Tabla 12. Determinación del error relativo de patrones de Fe en ron

Porcentaje recuperación: El porcentaje de recuperación se establece con las muestras de ron adicionadas.

Lecturas Fe	% Recuperación $\bar{u}M1$. Ab (1,0 mg/L)	% Recuperación $\bar{u}M1$. Aa (5,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	38,79	87,25
	36,65	88,03
Segunda lectura: 29/10/2010	-----	92,71
	-----	-----
Tercera lectura: 03/11/2010	61,03	93,68
	62,32	-----
Cuarta lectura: 09/12/2010	70,3	94,02
	67,64	93,68
Quinta lectura: 10/03/2011	77,93	91,10
	76,03	91,22
Sexta lectura: 10/03/2011	79,79	91,37
	79,01	91,37
Séptima lectura: 10/03/2011	80,63	94,53
	81,73	94,75
MEDIA	66,37	91,98

Tabla 13. Porcentaje de recuperación lectura de Fe en ron

Linealidad:

- Primera lectura: 27/10/2010

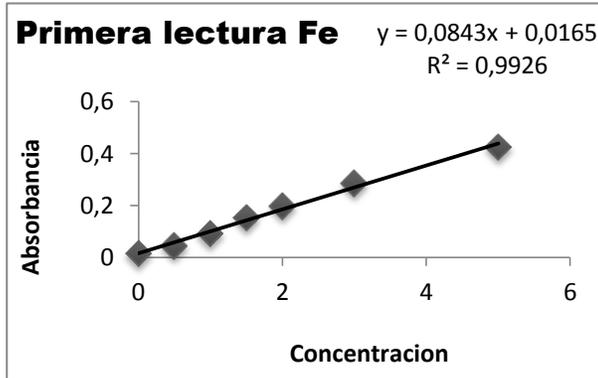


Fig 9. Primera grafica de Fe en ron

- Cuarta lectura: 09/12/2010

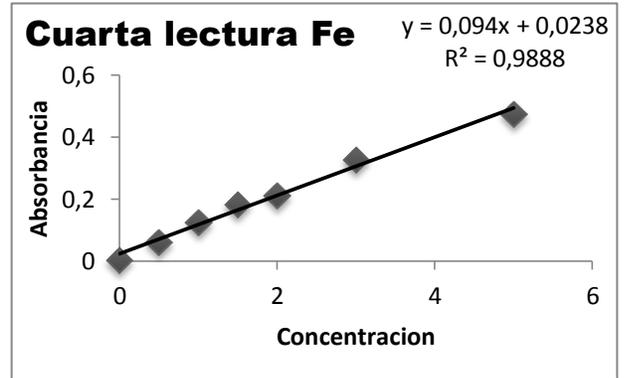


Fig 12. Cuarta grafica de Fe en ron

- Segunda lectura: 29/10/2010

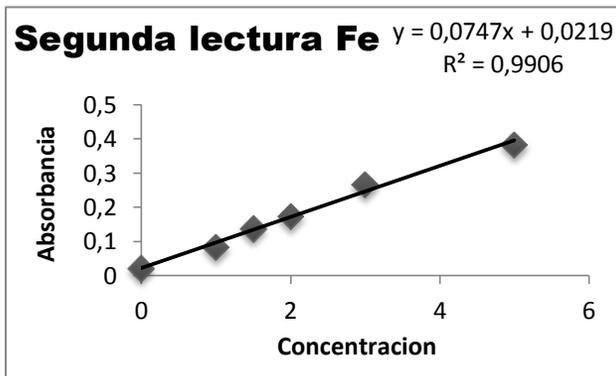


Fig10. Segunda grafica de Fe en ron

- Quinta lectura: 10/03/2011

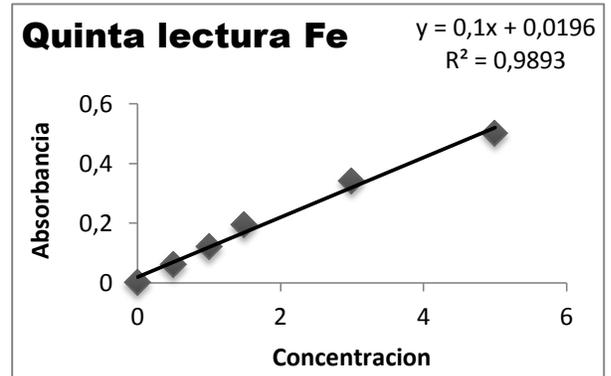


Fig13. Quinta grafica de Fe en ron

- Tercera lectura: 03/11/2011

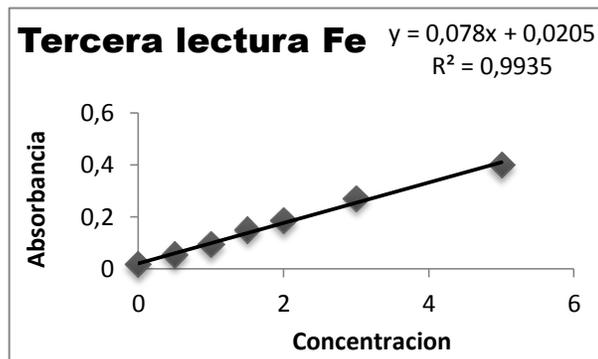


Fig 11. Tercera grafica de Fe en ron

- Sexta lectura: 10/03/2011

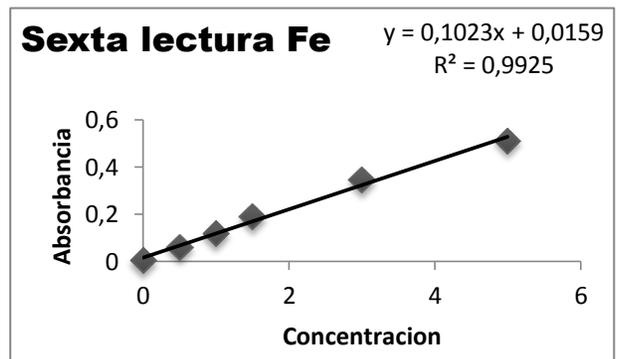


Fig14. Sexta grafica de Fe en ron

- Séptima lectura: 10/03/2011

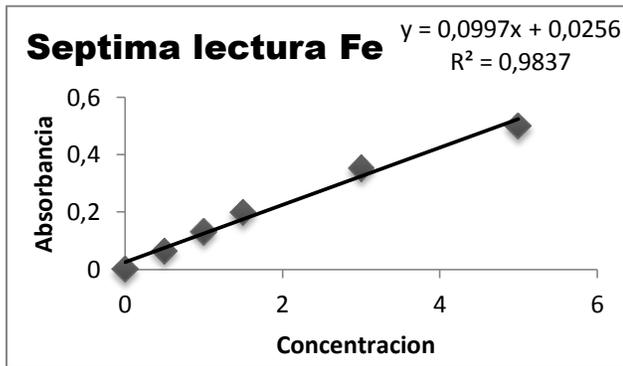


Fig 15. Septima grafica de Fe en ron

Se presenta la gráfica con los 7 ensayos de Fe realizados para corroborar la linealidad del método:

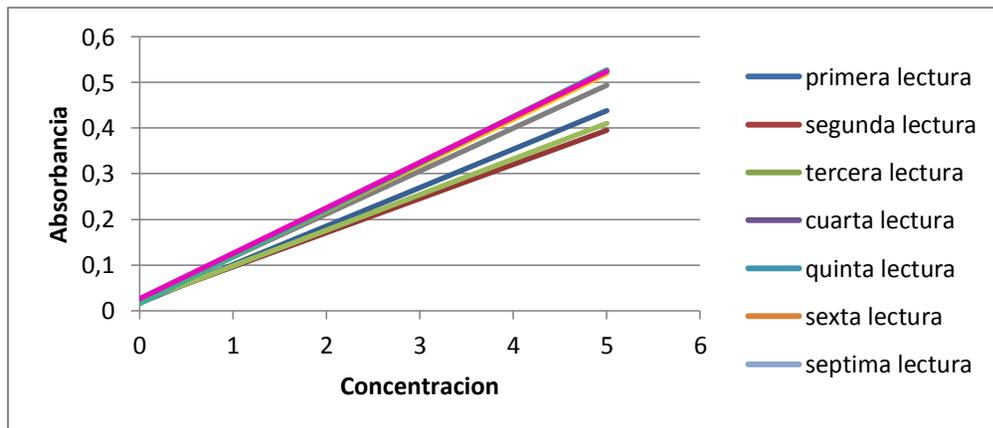


Fig16. Curvas de linealidad de Fe en ron

Se muestran también algunos datos para determinar la sensibilidad del equipo e igualmente verificar su linealidad.

Parámetro	Valor
R^2	0,9901
LD (mg/L)	0,0539
LC (mg/L)	0,6232
Sensibilidad	0,0901

Tabla 14. Estadísticos para determinar funcionamiento del equipo con Fe

Confiabilidad: Para mayor nivel de confianza se verifican los puntos de las lecturas con el criterio de rechazo.

Patrones	Tabla test	Tabla de máximo	Tabla de mínimo
Übk	2,37	1,1160	1,8696
Üeb (0,5 mg/L)	2,29	1,3756	1,6779
Üem (2,0 mg/L)	2,37	1,1648	1,2323
Üea (5,0 mg/L)	2,33	1,4428	1,5581
üM1. Ab (1,0 mg/L)	2,29	1,5113	1,0384
üM1. Aa (5,0 mg/L)	2,29	2,2829	1,4341
üM1	2,37	1,8351	1,1452

Tabla 15. Test de Grubbs para patrones de Fe en ron

6.2.3.2 Análisis de Cu

Patrones	Media	N	Desviación estándar	máximo	mínimo	Nivel confianza 95%
Übk	-0,0428	14	0,0719	0,0933	-0,1512	0,0415
Üeb (0,5 mg/L)	0,4810	8	0,0563	0,5876	0,4282	0,0470
Üem (1,5 mg/L)	1,6636	14	0,1824	1,9112	1,4392	0,1053
Üea (3,0 mg/L)	3,0827	14	0,4701	3,7377	2,0735	0,2714
üM1. Ab (1,0 mg/L)	0,8207	14	0,1006	0,9919	0,7255	0,0581
üM1. Aa (3,0 mg/L)	2,2130	12	0,1776	2,5248	2,0153	0,1128
Üm1	-0,0302	14	0,0651	0,0823	-0,1466	0,0376
Ron 0,5mg/L	0,5788	14	0,0798	0,6791	0,4697	0,0461
Ron 3mg/L	2,4748	14	0,2978	3,0148	1,955	0,1719

Tabla 16. Estadísticos determinados a los patrones de Cu en ron

Precisión: Para determinar la precisión del método, se determina el coeficiente de variación de los patrones y las muestras.

Patrones	CV
Üeb (0,5 mg/L)	11,6976
Üem (1,5 mg/L)	10,9669
Üea (3,0 mg/L)	15,2492
üM1. Ab (1,0 mg/L)	12,2642
üM1. Aa (3,0 mg/L)	8,0238
Ron 0,5mg/L	13,7877
Ron 3mg/L	12,0335

Tabla 17. Coeficientes de variación de patrones de Cu en ron

Exactitud: La exactitud del método se determina con los patrones de validación, calculando el porcentaje de error. (Üeb, Üem, Üea)

Lecturas Cu	Error relativo Üeb (0,5 mg/L)	Error relativo Üem (1,5 mg/L)	Error relativo Üea (3,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	6,62	2,89	2,71
	0,58	4,05	4,34
Segunda lectura: 29/10/2010	6,88	0,90	4,69
	17,52	0,68	3,18
Tercera lectura: 03/11/2010	9,78	27,41	24,59
	14,36	27,25	23,82
Cuarta lectura: 09/12/2010	9,78	0,77	27,18
	14,36	3,34	30,88
Quinta lectura: 10/03/2011	-----	15,11	7,83
	-----	15,39	8,21
Sexta lectura: 10/03/2011	-----	15,64	7,34
	-----	16,32	8,06
Séptima lectura: 10/03/2011	-----	24,51	8,37
	-----	21,90	7,62
MEDIA	9,99	12,58	12,06

Tabla 18. Determinación del error relativo de patrones de Cu en ron

Porcentaje recuperación: El porcentaje de recuperación se establece con las muestras de ron adicionadas

Lecturas Cu	% Recuperación µM1. Ab (1,0 mg/L)	% Recuperación µM1. Aa (3,0 mg/L)	% Recuperación Ron 0,5mg/L	% Recuperación Ron 3,0 mg/L
Primera lectura: 27/10/2010	75,85	66,64	98,72	81,84
	75,98	67,07	99,26	81,06
Segunda lectura: 29/10/2010	82,01	-----	116,02	91,41
	82,47	-----	114,8	90,19
Tercera lectura: 03/11/2010	90,96	81,39	119,2	97,51
	90,01	81,42	119,36	97,75
Cuarta lectura: 09/12/2010	109,33	71,62	120,4	68,63
	106,31	72,72	123,26	72,00
Quinta lectura: 10/03/2011	79,53	73,90	130,84	78,82
	80,08	74,36	131,56	79,33
Sexta lectura: 10/03/2011	81,51	74,16	131,82	83,32
	81,09	75,19	133,02	82,62
Séptima lectura: 10/03/2011	78,68	78,08	134,6	83,03
	77,37	76,79	132,22	81,48
MEDIA	85,08	74,44	121,79	83,50

Tabla 19. Porcentaje de recuperación en lecturas de Cu en ron

Linealidad: Para determinar Cobre en ron, se muestra la linealidad a continuación:

• **Primera lectura: 27/10/2011**

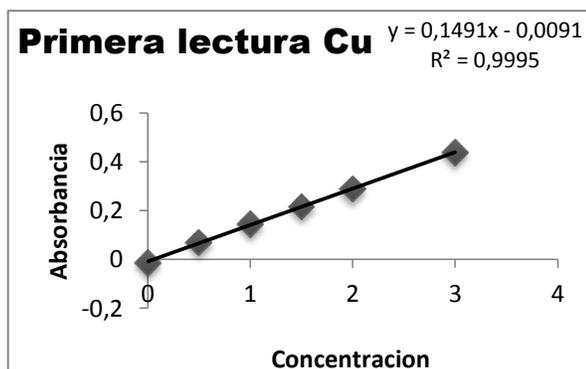


Fig 17. Primera grafica Cu en ron

Segunda lectura: 29/10/2010

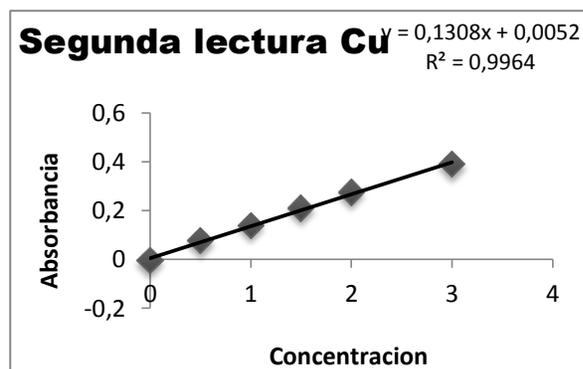


Fig18. Segunda grafica Cu en ron

- Tercera lectura: 03/11/2010

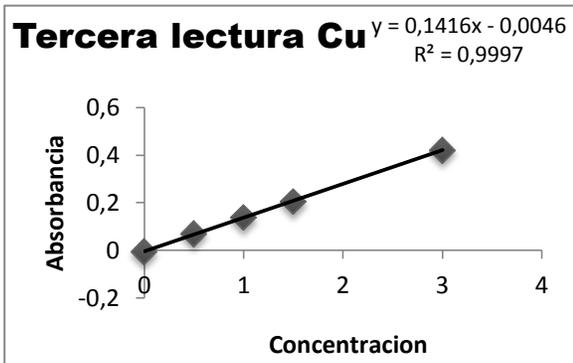


Fig19. Tercera grafica Cu en ron

- Sexta lectura: 10/03/2011

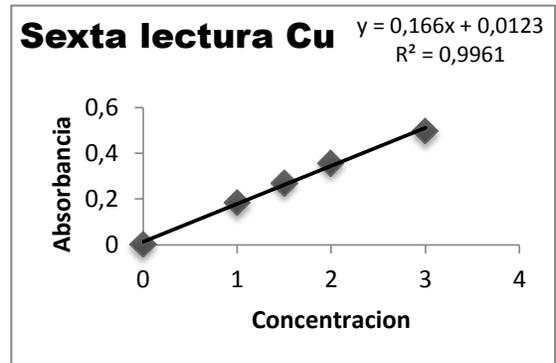


Fig 22. Sexta grafica Cu en ron

- Cuarta lectura: 09/12/2010

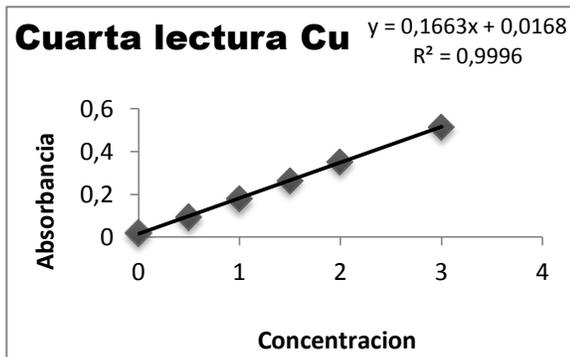


Fig 20. Cuarta grafica Cu en ron

- Séptima lectura: 10/03/2011

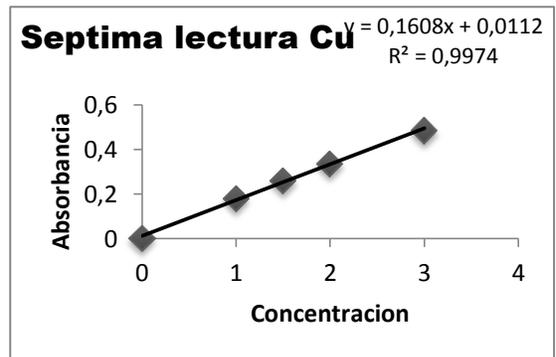


Fig23. Séptima grafica Cu en ron

- Quinta lectura: 10/03/2011

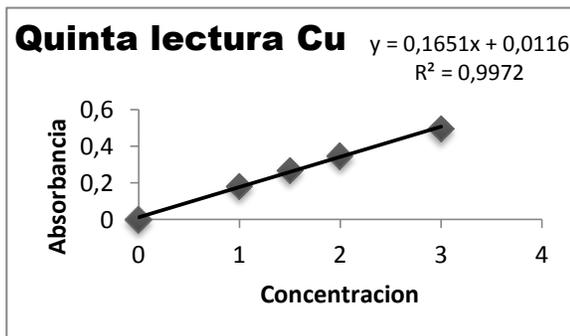


Fig21. Quinta grafica Cu en ron

Se presenta la gráfica con los 7 ensayos de Cu realizados para corroborar la linealidad del método:

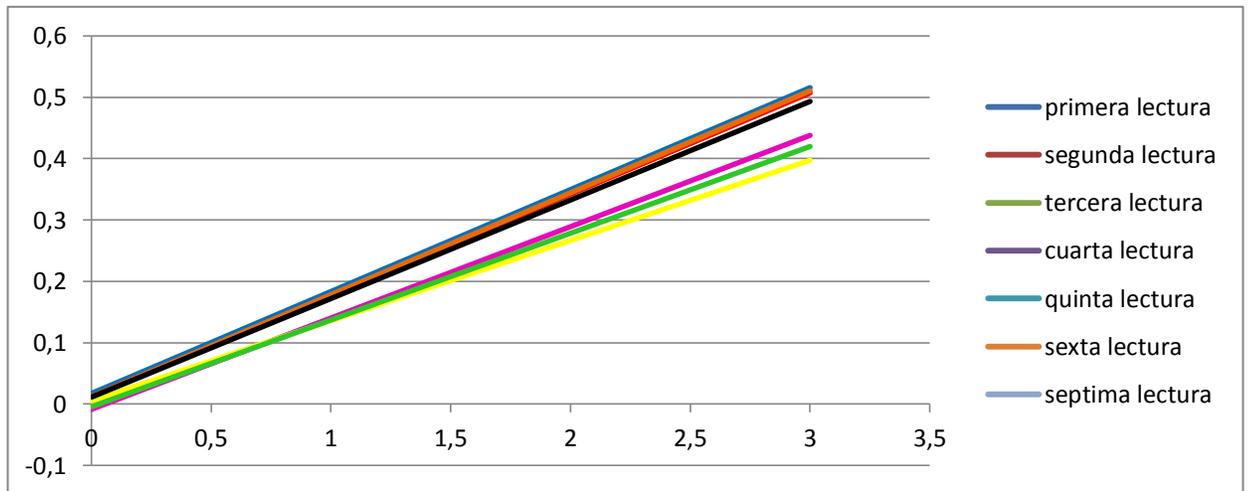


Fig 24. Curvas de linealidad de Cu

Se presentan también otros parámetros para sensibilidad y linealidad del equipo:

Parámetro	Valor
R^2	0,9981
LD (mg/L)	0,1729
LC (mg/L)	0,6762
Sensibilidad	0,1539

Tabla 20. estadísticos para determinar funcionamiento del equipo con Cu

Confiabilidad: Se realizó el test de Grubbs a los datos para analizar puntos de dispersión.

Patrones	Tabla test	Tabla de máximo	Tabla de mínimo
Übk	2,37	1,89297	1,507518773
Üeb (0,5 mg/L)	2,03	1,89513	0,938010544
Üem (2,0 mg/L)	2,37	1,35703	1,230029228
Üea (5,0 mg/L)	2,37	1,39336	2,146839929
üM1. Ab (1,0 mg/L)	2,37	1,70116	0,945642324
üM1. Aa (5,0 mg/L)	2,29	1,75627	1,113123604
üm1	2,37	1,72841	1,789441898
Ron 0.5 mg/L	2,37	1,25695	1,367041014
Ron 3mg/L	2,37	1,81324	1,745458624

Tabla 21. Test de Grubbs para patrones de Cu en ron

Observando los resultados obtenidos en la etapa de validación puede decirse:

Precisión

La precisión del método es adecuada en el análisis de Fe donde los coeficientes de variación obtenidos para el patrón de 5,0 mg/L y la muestra adicionada de concentración alta üM1.Aa de concentración alta (5,0 mg/L) está muy por debajo del límite 15%. Para la muestra adicionada üM1. Ab de concentración baja (1,0 mg/L) y los patrones de 0,5 y 2,0 mg/L se destacan valores de 15,0438; 15,1438 y 15,1519 respectivamente, ubicándose en el límite permitido sin sobrepasarlo notablemente; esto puede deberse a evaporación o pérdida de muestra por el constante calor al que se someten las mismas, error que se puede reparar con un calentamiento lento.

Para el análisis de Cu se determina una buena precisión ya que los patrones de 0.5, 1.5 y 3.0 mg/L y las muestras adicionadas de 0.5, 1.0 y 3.0 mg/L presentan coeficientes de variación entre el 8% y 15%, valores aceptables para la precisión del método.

Exactitud

La exactitud del método para análisis de Fe expresada como porcentaje de error muestra un bajo error de 3.64% en el patrón de 5.0 mg/L, para el patrón de 2.0 mg/L el porcentaje es de 13%, un valor relativamente aceptable ya que el límite establecido en el laboratorio es del 12%, en este caso se presentó una disminución de concentración en las tres últimas lecturas (anexo 4) que puede

deberse a descomposición del patrón con el paso del tiempo, otro factor puede ser una poca agitación de la muestra y por consiguiente un asentamiento en la concentración del metal; finalmente se evidencia un alto error de 25% en el patrón de 0.5 mg/L, donde las lecturas (anexo 4) muestran concentraciones inferiores a la deseada probablemente por pérdidas de muestra.

Para Cu, la exactitud se muestra adecuada ya que el patrón de 0.5 mg/L tiene un porcentaje de error inferior al 12% y los patrones de 1.5 y 3.0 mg/L están en un valor aproximado a este.

Porcentaje de recuperación

Para Fe la muestra con adición baja (**üM1b**) presento un porcentaje de recuperación de 66.37% un valor bajo debido a la primera lectura realizada (anexo 4), la cual muestra porcentajes de 38,79 y 36,65% que pueden deberse a un asentamiento de la muestra por falta de agitación, las demás lecturas de la muestra presentan porcentajes relativamente buenos; la muestra con adición alta (**üM1a**) presento un porcentaje de recuperación adecuado de 91.98%

Para el caso del Cu la muestra tratada con adición baja (**üM1b**) y dos muestras más adicionadas con 0.5 y 3.0 mg/L muestran valores de recuperación adecuados alrededor de 80y 121%; para la adición alta (**üM1a**) se presenta un valor de recuperación de 74.44%, un poco bajo pues la concentración leída evidencia pérdidas de la muestra.

Se puede comprobar que las muestras se encuentran en valores cercanos al rango de aceptación el cual va de 80 a 120%. Esto indica que el método de calcinación utilizado para la determinación de Fe y Cu en muestras de ron por absorción atómica en llama, presenta una buena recuperación del analito el cual no sufre demasiadas alteraciones durante el proceso de preparación y análisis; es importante regular el calentamiento lento para evitar disminución de la concentración en las muestras.

Linealidad

Cada uno de los ensayos de Fe y Cu presenta coeficientes de regresión superiores a 0,99 lo cual es el resultado de la alta correlación entre las variables y a su vez indica una buena linealidad del método. Al observar cada una de las graficas se corrobora lo dicho anteriormente determinando también que no se muestran puntos anormales dentro de las curvas.

Sensibilidad

El método tiene buena sensibilidad para ambos metales, tomando esta como la pendiente de la curva de calibración, la cual fue para Fe y Cu de 0,0901 y 0,1539 respectivamente. Lo anterior indica que el método puede detectar pequeñas variaciones de concentración en forma precisa cuando se realiza el análisis.

Límite de detección:

Fe: Para este metal la desviación estándar de una muestra natural adicionada con un valor de 1.0 mg/L es de ($s= 0,1177$)

El valor del límite de detección para el Fe es: 0,3532 mg/L

Un valor muy por debajo del límite máximo permitido por la NTC 278 de 8 mg/L

Cu: Tomando como referencia la desviación estándar de una muestra natural, adicionada con un valor de 0.5 mg/L ($s=0,0719$)

El valor del límite de detección para el Cu es: 0,2394 mg/L

Un valor 4 veces menor al requerimiento de la NTC 278 el cual estipula el valor máximo permitido como 1 mg /L

Límite de Cuantificación:

Fe: Para este metal la desviación estándar de una muestra natural adicionada con un valor de 1.0 mg/L es de ($s= 0,1177$)

El valor del límite de Cuantificación para Fe es: 1,1774 mg/L

Cu: Tomando como referencia la desviación estándar de una muestra natural, adicionada con un valor de 0.5 mg/L ($s=0,0719$)

El valor del límite de Cuantificación para Cu es: 0,798 mg/L

Confiabilidad

Para corroborar la confiabilidad del método se realizó el test de rechazo a las muestras en el análisis de ambos metales, certificando que todas las lecturas (anexo 4) cumplen con el rango y que únicamente se llegaron a rechazar dos datos de dispersión para cada muestra.

6.3 METODO DE COMPARACION

Para verificar si el método funciona en todas las bebidas espirituosas, se realiza la lectura con muestras de aguardiente igualmente suministradas por la Industria Licorera de Caldas. Las cuales se analizan siguiendo las mismas etapas anteriores.

6.3.1 FASE I

Se realizaron los mismos ensayos que en las muestras de ron, por digestión acida contaminando a (1mg/L) y calcinación contaminando a (3 mg/L), arrojando los siguientes resultados:

Fe	Concentración esperada mg/L	Std		Std average	
		Concentración leída mg/L	absorbancia	Concentración mg/L	absorbancia
Digestión Aguardiente	1 mg/L	0.7930	0.0715	0.7942	0.0716
		0.7953	0.0717		
Calcinación Aguardiente	3 mg/L	0.9935	0.0887	0.9924	0.0886
		0.9912	0.0885		

Tabla 22. Comparación de metodologías

Teniendo en cuenta los datos obtenidos después del tratamiento de la muestra, se decidió trabajar con la digestión acida ya que en la calcinación se evidencia gran pérdida de muestra esto puede deberse a que dicha matriz cuenta con un bajo contenido de materia orgánica, la cual se elimina fácilmente por digestión sin ser necesario someterla a rampas de calentamiento más elevadas.

6.3.2 FASE II

Igualmente se prepararon patrones de calibración y se contaminaron muestras de la bebida a diferentes concentraciones. En esta etapa no se realizaron patrones de validación ya que se pretende únicamente comprobar el método frente a otras matrices espirituosas.

6.3.2.1 Materiales y equipo

- **MATERIALES**

Balones Volumétricos de 200 mL y 100 mL
Bureta de 25 mL clase A
Erlenmeyer de 250 mL
Pipeta volumétrica de 2 mL clase A
Pipeta graduada de 1 mL clase A
Embudos de tallo largo
Frasco lavador
Porta muestras equipo SHIMADZU AA-7000

- **EQUIPOS**

Planchas de calentamiento
Espectrofotómetro de absorción atómica SHIMADZU AA-7000
Equipo de destilación Elix 10

6.3.2.2 Preparación de curvas de calibración

- **Patrones de Fe:** Se toma el volumen necesario de la solución madre de hierro para preparar cada uno de los patrones de acuerdo a la siguiente tabla:

Patrones	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Blanco	0,0	0,0
1	0,5	5
2	1.0	10
3	2.0	20
4	3.0	30
5	5.0	50

Tabla 23. Patrones de Fe para comparación de metodología

Posterior a ello, adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), aforar a 100 mL con agua desionizada. Leer Fe en el equipo de absorción atómica con corriente de lámpara de 10 mA, longitud de onda 248,3 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 2,2 L/min, tipo de llama aire-C₂H₂, altura del quemador 9 mm.

- **Patrones de Cu**

Se toma el volumen necesario de la solución madre de cobre para preparar cada uno de los patrones de acuerdo a la siguiente tabla:

Patrones	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Blanco	0,0	0,0
1	0,5	5
2	1.0	10
3	1.5	15
4	2.0	20
5	3.0	30

Tabla 24. Patrones de Cu para comparación de metodologías

Posterior a ello adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), aforar a 100mL con agua desionizada. Leer Cu en el equipo de absorción con corriente de lámpara de 8 mA, longitud de onda 324.8 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 1.8 L/min, tipo de llama aire-C₂H₂, altura del quemador 7 mm.

6.3.2.3 Preparación de muestras de aguardiente

- **Muestras para Fe**

Para realizar el respectivo análisis de Hierro, se utilizó una muestra de aguardiente tomando el volumen necesario de solución madre según la siguiente tabla:

Patrón	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Muestra natural de aguardiente Blanco	N.A	0
Muestra de aguardiente adicionada (1.0 mg/L)	1.0	10
Muestra de aguardiente adicionada (3.0 mg/L)	3.0	30

Tabla 25. Muestras de Fe en aguardiente

Posterior a ello adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), aforar a 100 mL con agua desionizada someter a calentamiento lento hasta casi sequedad, finalmente aforar a 100 mL con agua desionizada. Leer Fe en el equipo de absorción atómica con corriente de lámpara de 10 mA, longitud de onda 248,3 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 2,2 L/min, tipo de llama aire- C2H2, altura del quemador 9 mm

- **Patrones para Cu**

Para realizar el respectivo análisis de Hierro en la muestra, se utilizó una muestra de aguardiente tomando el volumen necesario de solución madre de 10 mg/L según la siguiente tabla:

Patrón	Concentración (mg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (mL)
Muestra natural de aguardiente Blanco	N.A	0
Muestra de aguardiente adicionada (1.0 mg/L)	1.0	10
Muestra de aguardiente adicionada (3.0 mg/L)	3.0	30

Tabla 26. Muestras de Cu para aguardiente

Posterior a ello adicionar 0.2 mL HNO₃ y 2 mL HCL (1:1), aforar a 100mL con agua desionizada, someter a calentamiento hasta casi sequedad y finalmente aforar con agua desionizada. Leer Cu en el equipo de absorción con corriente de lámpara de 8 mA, longitud de onda 324.8 nm, modo de lámpara BGC- D2, caudal del gas combustible 1.8 L/min, tipo de llama aire- C2H2, altura del quemador 7 mm.

6.3.3 FASE III

Las lecturas de aguardiente se realizaron en 5 días alternos (anexo5) garantizando que el método previamente seleccionado y las condiciones del equipo funcionaran adecuadamente. A continuación se presentan los resultados obtenidos y su respectivo análisis.

6.3.3.1 Análisis de Fe

Patrones	Media	N	Desviación estándar	máximo	mínimo	Nivel confianza 95%
Blanco	0,0556	10	0,0492	0,1457	-0,0129	0,0352
0,5	0,7770	10	0,1123	0,8948	0,6193	0,0803
1	1,1025	10	0,0583	1,1674	1,0056	0,0417
2	2,2203	10	0,0988	2,3773	2,0845	0,0707
3	3,1451	10	0,0494	3,2446	3,0578	0,0354
5	4,7765	10	0,0798	4,9291	4,6863	0,0571
Blanco aguad.	0,0725	15	0,0325	0,1039	0,0119	0,0180
Adic. 1mg/L	1,6337	15	0,0677	1,715	1,5097	0,0375
Adic. 3mg/L	2,6866	15	0,0917	2,7713	2,4847	0,0508

Tabla 27. Determinación de estadísticos para matriz de aguardiente

Precisión

Patrones	CV
0,5	14,4498
1	5,2867
2	4,4483
3	1,5717
5	1,6698
Adic. 1mg/L	4,1460
Adic. 3mg/L	3,4125

Tabla 28. Coeficiente variación de patrones en aguardiente

Exactitud

Lecturas Fe	Error relativo (0,5 mg/L)	Error relativo (1,0 mg/L)	Error relativo (2,0 mg/L)	Error relativo (3,0 mg/L)	Error relativo (5,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	23,86	4,43	6,07	3,21	1,42
	27,32	6,16	4,22	1,93	3,03
Segunda lectura: 29/10/2010	33,84	4,03	8,24	4,46	4,16
	36,02	0,56	7,23	5,62	2,84
Tercera lectura: 03/11/2010	64,82	13,47	18,87	5,06	6,27
	62,84	16,74	18,67	4,63	5,72
Cuarta lectura: 09/12/2010	77,88	15,55	13,22	5,06	5,48
	78,96	15,20	10,21	4,31	4,43
Quinta lectura: 10/03/2011	74,42	13,47	11,41	8,15	5,61
	74,06	12,92	12,05	5,91	5,75
MEDIA	55,40	10,25	11,02	4,84	4,47

Tabla 29. Error relativo de patrones de Fe en aguardiente

Porcentaje de recuperación

Lecturas Fe	% Recuperación (1,0 mg/L)	% Recuperación (3,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	140,78	81,16
	141,93	79,36
	145,2	81,61
Segunda lectura: 29/10/2010	152,12	86,73
	151,93	89,30
	151,16	88,34
Tercera lectura: 03/11/2010	160,86	88,54
	154,82	87,98
	158,58	87,45
Cuarta lectura: 09/12/2010	160,07	87,23
	160,34	89,33
	162,96	88,79
Quinta lectura: 10/03/2011	163,41	89,23
	167,91	90,18
	169,74	91,80
MEDIA	156,12	87,14

Tabla 30. Porcentaje recuperación muestras de Fe en aguardiente.

Linealidad

- Primera lectura: 07/06/2011

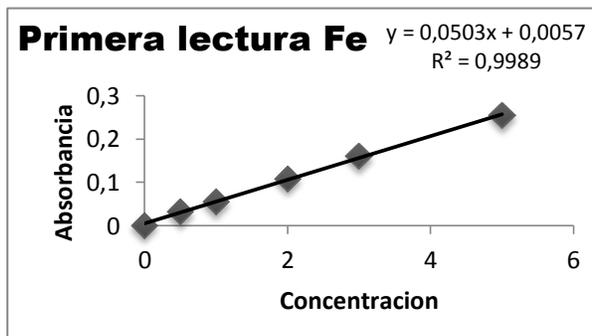


Fig25. Primera grafica Fe aguardiente

- Cuarta lectura: 13/06/2011

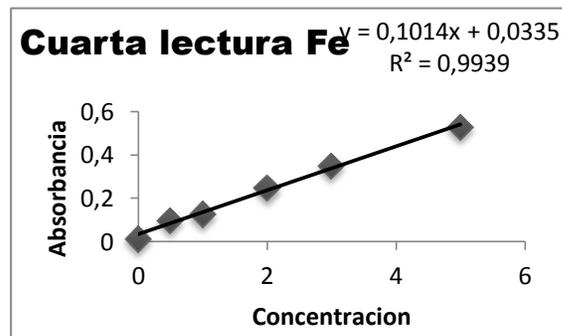


Fig28. Cuarta grafica Fe aguardiente

- Segunda lectura: 07/06/2011

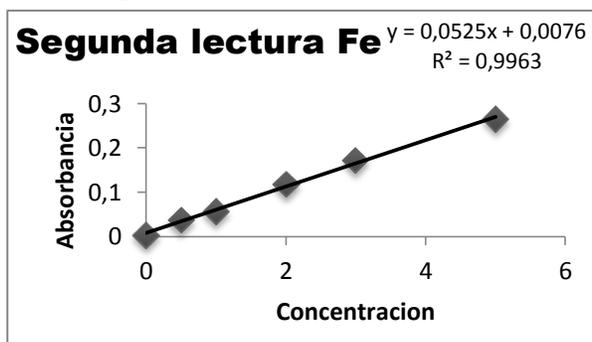


Fig26. Segunda grafica Fe aguardiente

- Quinta lectura: 13/06/2011

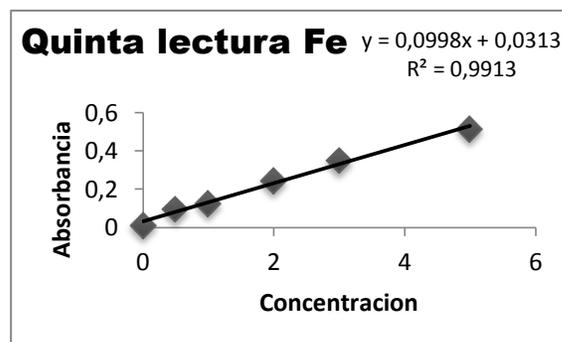


Fig29. Quinta lectura Fe aguardiente

- Tercera lectura: 09/06/2011

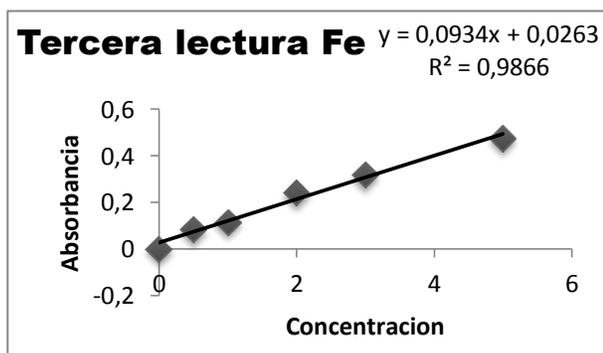


Fig27. Tercera grafica Fe aguardiente

Se presenta la gráfica con los 5 ensayos de Fe realizados para aguardiente, corroborando la linealidad del método:

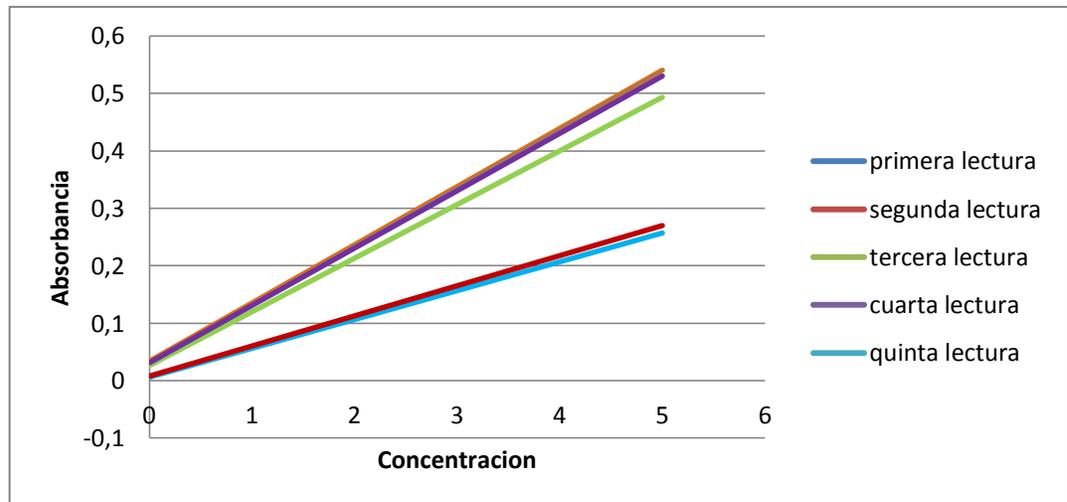


Fig30. Curvas para linealidad Fe en aguardiente

Algunos parámetros de sensibilidad y linealidad:

Parámetro	Valor
R	0,9934
LD (mg/L)	0,2032
LC (mg/L)	0,5476
Sensibilidad	0,079

Tabla 31. Parámetros para corroborar funcionamiento del equipo con Fe

Confiabilidad: Determinado por el test de Grubbs

Patrones	Tabla test	Tabla de máximo	Tabla de mínimo
Blanco	2,18	1,8316	1,3918
0,5	2,18	1,0491	1,4047
1	2,18	1,1129	1,6630
2	2,18	1,5894	1,3751
3	2,18	2,0139	1,7651
5	2,18	1,9140	1,1303
Blanco aguad.	2,41	0,9657	1,8637
Adic. 1mg/L	2,41	1,2002	1,8308
Adic. 3mg/L	2,41	0,9243	2,2018

Tabla 32. Test de Grubbs para patrones de Fe en aguardiente

6.3.3.2 Análisis de Cu

Patrones	Media	N	Desviación estándar	máximo	mínimo	Nivel confianza 95%
Blanco	-0,0137	10	0,0191	0,0131	-0,0368	0,0137
0,5	0,4998	10	0,0082	0,5145	0,4917	0,0058
1	0,9998	10	0,0277	1,0484	0,9726	0,0198
1,5	1,5075	10	0,0128	1,5257	1,491	0,0091
2	2,0254	10	0,0211	2,0562	1,9976	0,0151
3	2,9758	10	0,0220	3,0071	2,9421	0,0157
Blanco aguad.	-0,0147	10	0,0164	0,0131	-0,0362	0,0117
Adic. 1mg/L	1,0203	10	0,0306	1,0558	0,9706	0,0219
Adic. 3mg/L	2,9617	10	0,0316	3,005	2,9076	0,0226

Tabla 33. Estadísticos determinados a los patrones de Cu en aguardiente

Precisión

Patrones	CV
0,5	1,6342
1	2,7695
2	0,8468
3	1,0422
5	0,7396
Adic. 1mg/L	2,9989
Adic. 3mg/L	1,0680

Tabla 34. Coeficiente de variación de patrones de Cu en aguardiente

Exactitud

Lecturas Cu	Error relativo (0,5 mg/L)	Error relativo (1,0 mg/L)	Error relativo (1,5 mg/L)	Error relativo (2,0 mg/L)	Error relativo (3,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	1,04	2,74	0,43	2,81	1,72
	1,66	0,11	0,60	2,81	1,93
Segunda lectura: 29/10/2010	1,58	3,63	1,71	1,23	0,88
	1,32	4,84	1,03	0,01	1,22
Tercera lectura: 03/11/2010	2,9	2,02	0,55	0,74	0,28
	1,44	2,74	0,42	0,98	0,16
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,24	2,02	0,71	0,53	0,04
	0,96	2,38	0,16	0,12	0,24
Quinta lectura: 10/03/2011	2,06	1,79	1,08	2,10	0,84
	0,5	0,59	1,51	1,64	1,24
MEDIA	1,37	2,29	0,82	1,30	0,85

Tabla 35. Error relativo de patrones de Cu en aguardiente

Porcentaje de recuperación

Lecturas Cu	% Recuperación (1,0 mg/L)	% Recuperación (3,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	102,75	98,87
	101,31	97,68
Segunda lectura: 29/10/2010	101,83	99,92
	100,68	98,35
Tercera lectura: 03/11/2010	103,25	99,46
	104,1	100,23
Cuarta lectura: 09/12/2010	104,63	98,81
	102,85	99,25
Quinta lectura: 10/03/2011	107,47	99,70
	106,13	99,86
MEDIA	103,5	99,21

Tabla 36. Porcentaje de recuperación muestras de Cu en aguardiente.

Linealidad

- **Primera lectura: 30/05/2011**

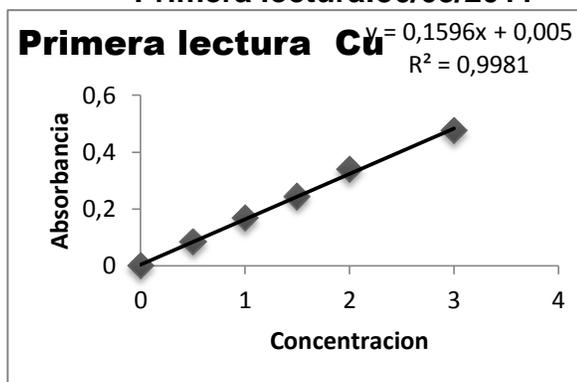


Fig31. Primera grafica Cu aguardiente

- **Segunda lectura: 01/06/2011**

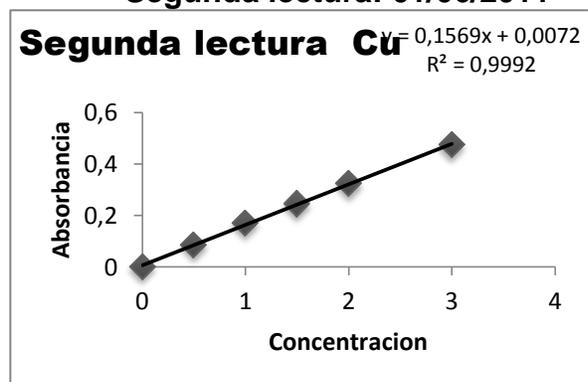


Fig32. Segunda grafica Cu aguardiente

- Tercera lectura: 07/06/2011

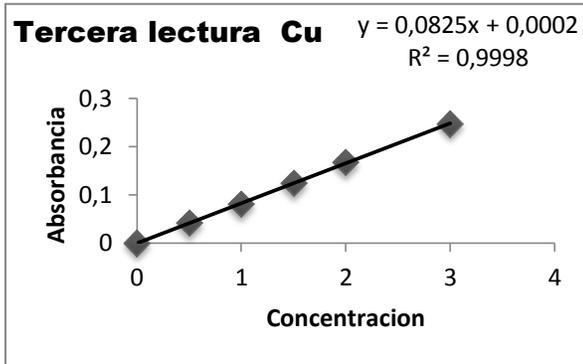


Fig33. Tercera grafica Cu en aguardiente

- Cuarta lectura: 07/06/2011

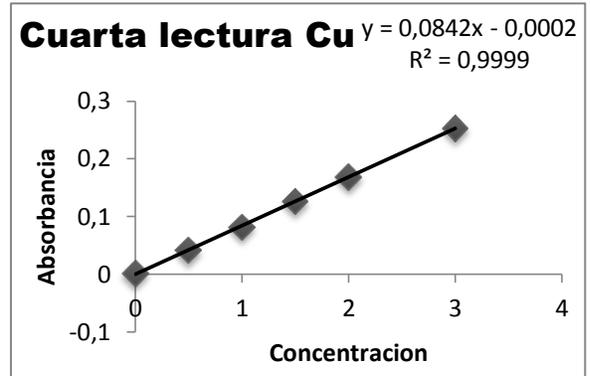


Fig34. Cuarta grafica Cu en aguardiente

- Quinta lectura: 09/06/2011

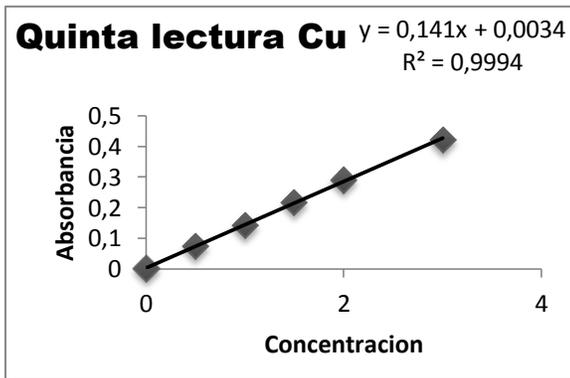


Fig35. Quinta grafica Cu en aguardiente

Se presenta la gráfica con los 5 ensayos de Cu realizados para aguardiente, corroborando la linealidad del método:

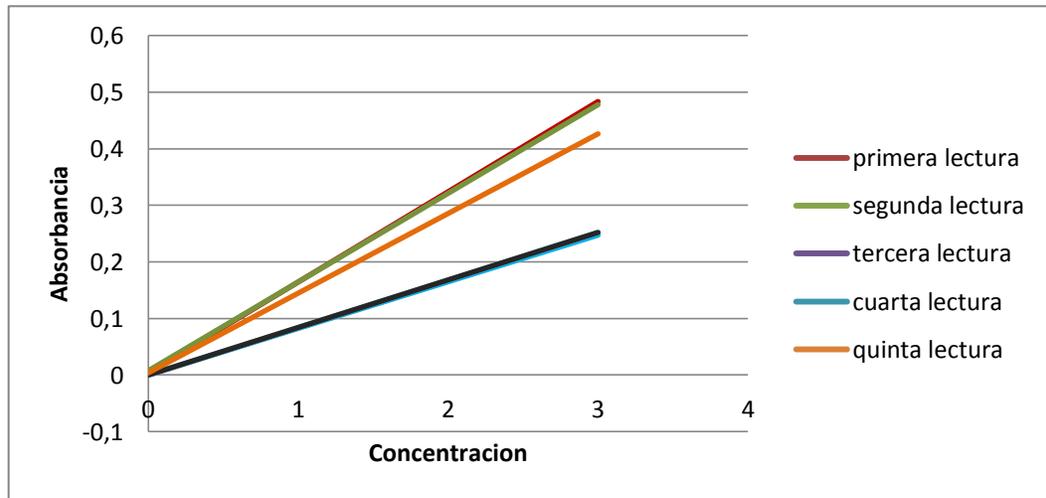


Fig36. Curvas para linealidad de Cu en aguardiente

Parámetros de sensibilidad y linealidad:

Parámetro	Valor
R^2	0,9993
LD (mg/L)	0,0438
LC (mg/L)	0,1778
Sensibilidad	0,1244

Tabla 37. Patrones para corroborar funcionamiento del equipo con Cu

Confiabilidad:

Patrones	Tabla test	Tabla de máximo	Tabla de mínimo
Blanco	2,18	1,3982	1,2081
0,5	2,18	1,8010	0,9905
1	2,18	1,7559	0,9816
2	2,18	1,4273	1,2910
3	2,18	1,4576	1,3184
5	2,18	1,4230	1,5303
Blanco agud.	2,18	1,6937	1,3131
Adic. 1mg/L	2,18	1,1592	1,6253
Adic. 3mg/L	2,18	1,3698	1,7094

Tabla 38. Test de Grubbs para patrones de Cu en aguardiente

De acuerdo a los datos presentados para el método de comparación realizado con aguardiente, puede decirse:

Precisión

En el análisis de Fe los coeficientes de variación obtenidos para los patrones de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/L y para las muestras adicionadas de concentraciones 1,0 y 3,0 mg/L no sobrepasan el límite permitido de 15%, mostrando una buena precisión para el análisis del metal.

Para el Cu los coeficientes de variación de los patrones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 3.0 mg/L y las muestras adicionadas de 1.0 y 3.0 mg/L no sobrepasan el 3%, lo cual indica una excelente precisión del método para el análisis de este metal.

Exactitud

La exactitud del método para análisis de Fe muestra porcentajes de error por debajo del 12% para patrones de 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/L; sin embargo el patrón de 0.5 mg/L presenta un alto error 55.4% el cual puede deberse según las lecturas (anexo 5) a una contaminación de la muestra o una mala medición del analista al momento de adicionar el metal, ya que se leen concentraciones más altas de la requerida.

Para Cu, la exactitud se muestra adecuada ya que el porcentaje de error de todos los patrones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 3.0 mg/L) está por debajo del 3%.

Porcentaje de recuperación

Para Fe la muestra con adición baja (1.0 mg/L) presento un porcentaje de recuperación de 156.12% el cual sobrepasa el rango de aceptación 80-120%, esto puede deberse a una contaminación de la muestra ya que como se observa en las lecturas (anexo 5) la concentración marca por encima del valor adicionado, dando así lugar a valores de recuperación más altos de los que se deberían obtener, para verificar lo dicho, se realizo una verificación de toda la metodología y de esta manera minimizar errores; por el contrario, la muestra con adición alta (3.0 mg/L) presento un porcentaje de recuperación adecuado de 87.14%

Para el caso del Cu ambas muestras presentan valores de recuperación dentro del rango de aceptación.

Linealidad

Para cada uno de los metales analizados Fe y Cu, se presentan coeficientes de regresión próximos lo cual es el resultado de la alta correlación entre las variables y a su vez indica una buena linealidad del método. Al observar cada una de las graficas se corrobora lo dicho anteriormente determinando también que no se muestran puntos anormales dentro de las curvas.

Sensibilidad

El método tiene buena sensibilidad para ambos metales, tomando esta como la pendiente de la curva de calibración, la cual fue para Fe y Cu de 0,079y 0,1244 respectivamente. Lo anterior indica que el método puede detectar pequeños cambios de concentración en forma precisa cuando se realiza el análisis.

Limite de detección:

Fe: Para este metal la desviación estándar de una muestra natural adicionada con un valor de 1.0 mg/L es de ($s= 0,0677$)

El valor del límite de detección para el Fe es: 0,2032mg/L

Un valor debajo del límite máximo permitido por la NTC 411 de 8 mg/L

Cu: Tomando como referencia la desviación estándar de una muestra natural, adicionada con un valor de 1.0 mg/L ($s=0.0306$)

El valor del límite de detección para el Cu es: 0,0918 mg/L

Un valor menor al requerimiento de la NTC 411 el cual estipula el valor máximo permitido como 1 mg /L

Limite de Cuantificación:

Fe: Para este metal la desviación estándar de una muestra natural adicionada con un valor de 1.0 mg/L es de ($s= 0,0677$)

El valor del límite de Cuantificación para Fe es: 0,6773 mg/L

Cu: Tomando como referencia la desviación estándar de una muestra natural, adicionada con un valor de 1.0 mg/L ($s=0.0306$)

El valor del límite de Cuantificación para Cu es: 0,306 mg/L

Confiabilidad:

Para corroborar la confiabilidad del método se realizó el test de rechazo a las muestras en el análisis de ambos metales, certificando que todas las lecturas (anexo 5) cumplen con el rango y que únicamente se llegaron a rechazar dos datos de dispersión para cada muestra.

6.4 VERIFICACION DE LAS METODOLOGIAS

Finalmente se realizan lecturas de ron viejo de Caldas tradicional 3 años y aguardiente con las condiciones y metodologías planteadas en el desarrollo de proyecto; como se dijo anteriormente, con el fin de corregir errores y verificar si la validación produjo los resultados esperados, se presta especial cuidado de no adicionar exceso de volumen en la muestra al momento de contaminarla e igualmente cuidar que en ningún instante se presenten pérdidas del analito. A continuación se muestran las lecturas realizadas a las muestras:

6.4.1 Lectura de Fe

Fe	
concentración	absorbancia
0 (blanco)	0,0034
0,5	0,0426
1	0,10465
1,5	0,16165
2	0,2137
3	0,2899
5	0,4843

Curva de calibración Fe $y = 0,0951x + 0,0107$
 $R^2 = 0,9998$

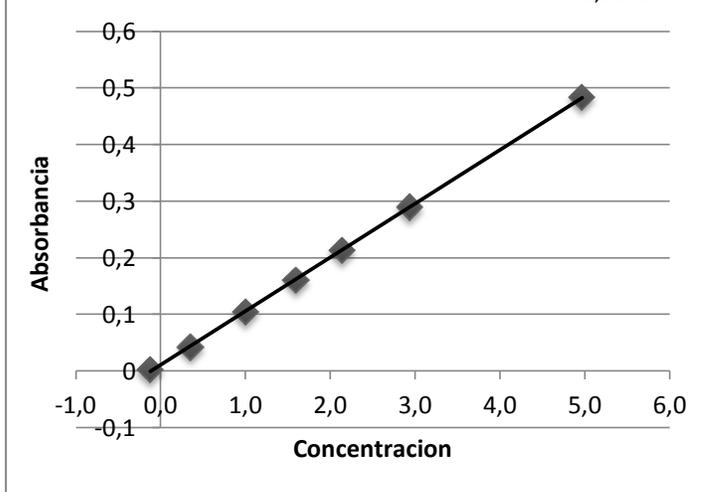


Tabla 39. Patrones Fe para Verificación

Fig 37. Curva de calibración Fe para verificación

Fe	Std		Std average	
	concentración	absorbancia	concentración	absorbancia
Bco. ron	-0,0025	0,0083	-0,0077	0,0079
	-0,0088	0,0077		
	-0,0119	0,0074		
Adicionada 1 ron 2mg/L	1,6008	0,1619	1,6074	0,1625
	1,6091	0,1627		
	1,6122	0,163		
Adicionada 2 ron 2mg/L	1,9369	0,1941	1,9372	0,1941
	1,9233	0,1928		
	1,9515	0,1955		
Bco. aguardiente	-0,1506	0,0002	-0,1477	0,0005
	-0,1495	0,0003		
	-0,1431	0,0009		
Adic. aguardiente 2mg/L	2,1999	0,2193	2,1724	0,2167
	2,1707	0,2165		
	2,1467	0,2142		

Tabla 40. Lecturas Fe en muestras de ron y aguardiente

Fe mg/L	% error
0,5	29,10
	28,90
1	0,37
	0,27
1,5	6,23
	6,85
2	6,81
	7,34
3	2,28
	1,93
5	1,20
	0,16
Media	7,62

Tabla 41. Porcentajes de error patrones de Fe para verificación

	Adic. 1 ron 2mg/L	Adic. 2 ron 2mg/L	Adic. aguardiente 2mg/L
%R	80,76	97,25	116,01

Tabla 42. Porcentaje de recuperación muestras adicionadas Fe en ron y aguardiente.

6.4.2 Lectura de Cu

Cu	
concentración	absorbancia
0 (blanco)	0,0034
0,5	0,0426
1	0,10465
1,5	0,16165
2	0,2137
3	0,2899

Tabla43. Patrones Cu para Verificación

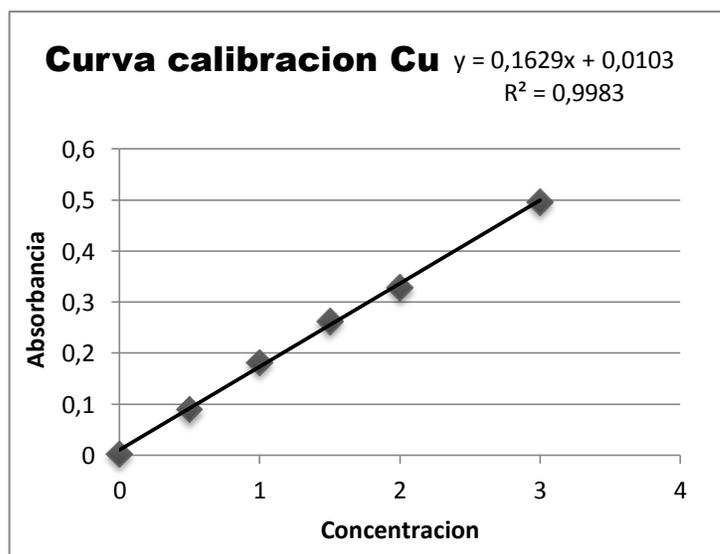


Fig38. Curva calibración Cu para verificación

Cu	std		Std average	
	concentración	absorbancia	concentración	absorbancia
Bco. ron	-0,0251	0,0124	-0,0258	0,0123
	-0,0264	0,0122		
Adicionada 1 ron 2 mg/L	1,8197	0,3075	1,8188	0,3075
	1,818	0,3072		
Adicionada 2 ron 2 mg/L	1,7553	0,2972	1,7516	0,2966
	1,7478	0,296		
Bco. aguardiente	-0,1045	-0,0003	-0,1048	-0,0004
	-0,1051	-0,0004		
Adic. aguardiente 2mg/L	2,051	0,3445	2,0529	0,3448
	2,0547	0,3451		

Tabla 44. Lecturas Cu en muestras ron y aguardiente

Cu mg/L	% error
0,5	7,00
	8,38
1	5,01
	3,51
1,5	2,73
	2,39
2	2,11
	2,49
3	0,81
	0,56
Media	3,50

Tabla 45. Porcentajes de error patrones de Cu para verificación

	Adic. 1 ron 2mg/L	Adic. 2 ron 2mg/L	Adic. aguardiente 2mg/L
%R	92,23	88,87	107,88

Tabla 46. Porcentajes de recuperación muestra adicionadas con Cu

- Por los porcentajes de recuperación de las muestras y la linealidad de las curvas, se pudo comprobar que el método analizado es el adecuado, para hallar Cu y Fe en Ron y otras bebidas alcohólicas.
- La precisión en la lectura de estos dos metales, es adecuada tanto en la matriz de ron como en la de aguardiente, ya que para ambos casos el método tiene una buena repetibilidad y reproducibilidad, lo cual indica que no hay una dispersión considerable que afecte la lectura de las muestras.
- Se presentan porcentajes de error bajos para ambos metales, a excepción del patrón de 0,5 mg/L de Cu que presenta valores un poco altos, eso puede deberse a una pérdida de muestra; sin embargo en términos generales se muestra una buena exactitud en los métodos.
- El valor de R^2 es adecuado ya que los valores obtenidos se aproximan a 1 que es lo ideal, generando de este modo una línea recta, como resultado de una alta correlación entre las variables.

Con todos los resultados antes expuestos, se comprueba que el método de absorción atómica de llama para el análisis de Hierro y Cobre en bebidas espirituosas es adecuado para su aplicación en el laboratorio de análisis de aguas y alimentos, ya que los niveles de rendimiento especificados que se obtuvieron en esta validación cumplen los parámetros estadísticos que el laboratorio requiere.

7. CONCLUSIONES

- Se evaluó un formato de procedimientos para cada una de las matrices analizadas.
- Se validó la técnica de determinación de Fe y Cu en diferentes matrices en el laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- La metodología empleada en el análisis de las diferentes matrices evidentemente fue adecuada, utilizando la calcinación para bebidas espirituosas con alto contenido de materia orgánica (ron) y la digestión acida para matrices con más bajo nivel orgánico (aguardiente). Esto se pudo evidenciar en los valores arrojados por los diferentes parámetros estadísticos que se le realizaron a las muestras.
- Los patrones realizados tuvieron una preparación adecuada ya que su comportamiento es lineal, lo cual indica que el coeficiente de correlación es muy bueno y confiable.
- La buena exactitud y precisión en términos de reproducibilidad y repetitividad de los resultados obtenidos en las técnicas validadas indican la presencia de errores aleatorios pequeños, haciendo que los resultados de la validación no difieran mucho entre sí.
- Se estableció experimentalmente y para las condiciones del laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, los atributos de las técnicas: precisión en términos de repetitividad y reproducibilidad, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad.
- Al realizar el análisis de las muestras naturales, se demostró que no contenían los metales estudiados, lo cual manifiesta una excelente calidad en los productos de la ILC.

8. RECOMENDACIONES

- Se debe realizar un buen y completo análisis estadístico que permita determinar y comprobar que dicho método si tiene aplicabilidad en el laboratorio.
- Se debe asegurar un lento calentamiento de las muestras, para poder garantizar que no haya pérdidas, y por ende una mala lectura de los metales.
- Durante el análisis de Hierro se observó una degradación del mismo durante el paso del tiempo, por tal razón es muy importante realizar los ensayos en un periodo corto para así, evitar errores en las lecturas.
- Al momento de llevar a cabo la preparación de patrones, se debe trabajar con material volumétrico de alta calidad, el cual garantice una medida adecuada de las alícuotas necesitadas para la preparación de cada muestra.
- Es de suma importancia conocer qué tipo de interferencias presentan los ácidos utilizados en el tratamiento de las muestras, para que no haya un solapamiento de los metales objeto de análisis.
- Cuando las muestras son llevadas a calcinación, se debe programar adecuadamente la rampa de calentamiento; es recomendable una rampa lenta, esto con el fin de garantizar que no haya pérdida de muestra, y que se elimine completamente la materia presente en dicha matriz.
- Antes de empezar a trabajar, se debe lavar todo el material, con jabón libre de Sulfatos y posterior a ello adicionar ácido nítrico 1-1, el cual facilite la eliminación de jabón que puede quedar presente en el material de vidrio; finalmente purgar con agua desionizada, para garantizar que el material este completamente limpio.

9. BIBLIOGRAFIA

[1] Industria Licorera de Caldas, Actualizado (Viernes, 19 de agosto de 2011 9:11am) Disponible en: <http://www.ilc.com.co>

[2] IBANEZ J., Carreon-Alvarez A., Barcena-Soto M., Casillas N. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 672– 683 (2008), artículo version pdf

[3] EURACHEM, “The fitness for Purpose of analytical methods. A laboratory Guide to method validation and related topics” EURACHEM Secretariat, Teddington, Middlesex, 1998

[4] COY G., Protocolo, Estandarización de métodos analíticos, Bogotá Colombia, noviembre de 1999

[5] RIUS X., MAROTO A., BOQUÉ R., RIU J., La validación de métodos analíticos, Departamento de química analítica y química orgánica, Instituto de estudios avanzados Universitat Rovira i Virgili, Tarrogonia España, noviembre de 2010, artículo versión pdf

[6] Que son las bebidas espirituosas y su materia prima, Categoría alimentos y bebidas Federación Española de bebidas espirituosas (Febe), Madrid (España), Noviembre de 2008. Disponible en: <http://www.febe.es>

[7] Bebidas Tecnología, química y microbiología, Alan H. Varnam, Jane P. Sutherland, Serie alimentos básicos 2, editorial Acriba S.A, Zaragoza España 1997

[8] Caracterización analítica de aguardientes anisados, José Marcos Jurado J., Capítulo 1, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, 2004. Versión pdf.

[9] Classification of Venezuelan spirituous beverages by means of discriminant analysis and artificial neural networks based on their Zn, Cu and Fe concentrations. Edwin A. Hernandez-Caraballo, Rita M. Avila-Gomez, Tarcisio Capote, Francklin Rivas, Anna G. Perez. *ScienceDirect*. Venezuela Abril 2003

[10] Principios de Análisis Instrumental. Douglas A. Skoog; F. James Holler; Stanley R. Crouch; Sexta Edición. Cengage Learning.

[11] Atomic Absorption spectrophotometry Cookbook, Section 1-7, Basic Conditions of Analysis of Atomic Absorption Spectrophotometry. Shimadzu Corporation.

[12] Aplicación de una metodología para estandarizar y validar los ensayos de As, Cr, Hg y Na por espectrometría de absorción atómica en el laboratorio de Química Ambiental. Andrés Mauricio Camacho Orrego. Tesis Tecnólogo Químico, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología, Escuela de Química, Pereira 2008.

[13] Definiciones de calidad, evolución, historia y actualidad. Gestión de calidad. Ing. Giraldo O'Reilly Crespo. Actualizado 16/03/2010. Disponible en: www.gestiopolis.com

[14] Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, Edited by Lenore S. Clesceri, Arnold E. Greenberg, Andrew D. Eaton, January 1999, ISBN-10/ASIN : 0875532357, ISBN-13/ EAN: 9780875532356

[15] Norma Técnica Colombiana versión 2005. Bebidas alcohólicas, 278 ron, 411 anís o anisados.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Norma Técnica Colombiana NTC 278 Bebidas alcohólicas. Ron

- **OBJETO**

Esta norma establece los requisitos y ensayos que debe cumplir la bebida alcohólica denominada ron.

- **DEFINICIONES**

Para los efectos de esta norma se establecen las siguientes definiciones además de las contempladas en la NTC 222:

- **Ron:** Aguardiente obtenido por destilación especial de mostos fermentados del zumo de caña de azúcar, sus derivados o sus productos, y no se priva de los principios aromáticos a los cuales debe sus características específicas, se madura mínimo seis meses en recipientes de roble, de forma que al final posee el gusto y el aroma que le son característicos. También se puede obtener por muestras de rones.
- **Ron joven o blanco:** Ron que se ha sometido a un proceso de maduración mínimo de seis meses.
- **Ron añejo o viejo:** Ron que se ha sometido a un proceso de maduración mínimo de tres años.
- **Ron muy añejo extrañejo o extraviejo:** Ron que se ha sometido a un proceso de maduración mínimo de cinco años.
- **Maduración o añejamiento:** Proceso que consiste en dejar desarrollar naturalmente en recipientes apropiados de madera de roble, ciertas reacciones químicas que confieren a la bebida alcohólica cualidades sensoriales particulares del producto. Se deben conservar los registros que permitan hacer la trazabilidad del tiempo de añejamiento.
- **Tiempo de maduración:** Numero de meses o años cumplidos a partir de la fecha en que se inició la maduración.
Nota: Cuando se mezclan rones de diferentes edades, se considera como edad de la mezcla la más joven, sin tener en cuenta su proporción.

- **Congéneres:** Sustancias volátiles naturales diferentes de los alcoholes etílico y metílico, las cuales provienen de las materia primas empleadas o que se han originado durante el proceso de elaboración de una bebida alcohólica. Dentro de los congéneres se consideran sustancias tales como ácidos, aldehídos, furfural, esteres y alcoholes superiores.

- **REQUISITOS GENERALES**

- El ron debe ser un líquido transparente que posea el aroma, color y sabor generalmente atribuidos a este.
- El sabor del ron se puede suavizar por adición de azúcar u otro edulcorante permitido
- El color se puede modificar con caramelo o carbón activado.
- Se podrán agregar maceraciones, lixiviaciones o extracciones de frutas frescas o secas, cortezas o virutas de roble.
- En la elaboración de ron no se permite ninguna de las siguientes prácticas: Adición de edulcorantes diferentes al caramelo de azúcar.
Adición de edulcorantes artificiales.
Adición de esenciales naturales o artificiales o de bonificadores total o parcialmente sintéticos, que modifiquen las características sensoriales del ron.
Cualquier práctica tendiente a sustituir el tiempo de añejamiento natural en recipientes de roble.

- **REQUISITOS ESPECIFICOS**

El ron deberá cumplir con los siguientes requisitos fisicoquímicos especificados en la tabla:

Requisitos	Valores	
	Mínimo	Máximo
Contenido de alcohol en grados alcoholimetricos a 20°C	35	----
Extracto seco total, expresado en mg/dm ³ a 100°C- 105°C	-----	20000
Acidez total, expresado como acido acético en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-----	1000
Acidez volátil, expresado como acido acético en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-----	1000
Aldehídos, expresado como aldehído acético en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-----	400
Esteres, expresado como acetato de etilo en mg/dm ³ de alcohol anhidro	----	10000
Alcoholes superiores, expresado como alcohol amílico en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-----	3000
Total de congéneres (acidez volátil, aldehídos, esterres, furfural, y alcoholes superiores) en mg/dm ³ de alcohol anhidro	250	-----
Metanol en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-----	300
Furfural en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-----	10
Cobre expresado como Cu en mg/dm ³	-----	1
Hierro expresado como Fe en mg/dm ³	-----	8

ANEXO 2. Norma Técnica Colombiana 278 Bebidas alcohólicas. Anís o anisado

- **OBJETO**

Esta norma establece los requisitos y ensayos que debe cumplir la bebida alcohólica denominada anís o anisado.

- **DEFINICIONES**

Para los efectos de esta norma se establecen las siguientes:

- **Anís o anisado:** Licor obtenido por destilación alcohólica en presencia de semillas maceradas de anís (anís común, estrellado o su mezcla), al que se adicionan o no otras sustancias aromáticas, de destilación y posterior dilución hasta el grado alcohólico correspondiente. Se pueden adicionar otras sustancias aromáticas edulcorantes o colorantes permitidos.

NOTA: En Colombia se da la denominación de aguardiente al licor anisado, que se obtiene destilando una maceración de semillas de anís (anís común, estrellado o su mezcla) adicionado o no de otras sustancias aromáticas en alcohol rectificado neutro o extraneutro, o mezclando alcohol rectificado neutro con agentes aromáticos seguido o no de destilación, adicionando o no otras sustancias aromáticas, edulcorantes o colorantes permitidos.

- **Congéneres:** Sustancias volátiles naturales diferentes de los alcoholes etílico y metílico, las cuales provienen de las materia primas empleadas o que se han originado durante el proceso de elaboración de una bebida alcohólica. Dentro de los congéneres se consideran sustancias tales como ácidos, aldehídos, furfural, ésteres y alcoholes superiores

- **CLASIFICACION**

El anís o anisado de acuerdo con su contenido de azúcar se clasifica en: Seco, semiseco y dulce.

- **REQUISITOS GENERALES**

- Los colorantes, edulcorantes y aromatizantes empleados en la elaboración del anís o anisado, serán los permitidos por el ministerio de protección social.

- **REQUISITOS ESPECIFICOS**

El anís o anisado deberá cumplir con los siguientes requisitos especificados en la tabla:

Requisitos	Limite
Contenido de alcohol en grados alcoholimetricos a 20°C	29
Azucares totales, expresado como sacarosa en g/dm ³	-----
Seco	0
Semiseco	0,1-50
Dulce	5,1-150
Total de congéneres (acidez volátil, aldehídos, esteres, furfural, y alcoholes superiores) en mg/dm ³ de alcohol anhidro	80
Metanol en mg/dm ³ de alcohol anhidro	ND
Furfural en mg/dm ³ de alcohol anhidro	100
Cobre expresado como Cu en mg/dm ³	1
Hierro expresado como Fe en mg/dm ³	8

ANEXO 3. Valores de T. de Grubbs, para rechazo de datos

N	0,1	0,075	0,05	0,025	0,01
3	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15
4	1,42	1,44	1,46	1,48	1,49
5	1,6	1,64	1,67	1,71	1,75
6	1,73	1,77	1,82	1,89	1,94
7	1,83	1,88	1,94	2,02	2,1
8	1,91	1,96	2,03	2,13	2,22
9	1,98	2,04	2,11	2,21	2,32
10	2,03	2,1	2,18	2,29	2,41
11	2,09	2,14	2,23	2,36	2,48
12	2,13	2,2	2,29	2,41	2,55
13	2,17	2,24	2,33	2,46	2,61
14	2,21	2,28	2,37	2,51	2,66
15	2,25	2,32	2,41	2,55	2,71
16	2,28	2,35	2,44	2,59	2,75

ANEXO 4. Lecturas de ron

- Hierro

Lecturas Fe	Übk
Primera lectura: 27/10/2010	-0,1152
	-0,1164
Segunda lectura: 29/10/2010	-0,2545
	-0,2612
Tercera lectura: 03/11/2010	-0,1481
	-0,0993
Cuarta lectura: 09/12/2010	-0,149
	-0,1351
Quinta lectura: 10/03/2011	-0,2195
	-0,2035
Sexta lectura: 10/03/2011	-0,1502
	-0,1296
Séptima lectura: 10/03/2011	-0,3421
	-0,3371

Lecturas Fe	Üeb (0,5 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	0,2797
	0,2797
Segunda lectura: 29/10/2010	-----

Tercera lectura: 03/11/2010	0,3777
	0,3802
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,3392
	0,3796
Quinta lectura: 10/03/2011	0,4248
	0,4148
Sexta lectura: 10/03/2011	0,4483
	0,4531
Séptima lectura: 10/03/2011	0,3558
	0,3669

Lecturas Fe	Üem (2,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	2,1525
	2,1145
Segunda lectura: 29/10/2010	1,8646
	1,9181
Tercera lectura: 03/11/2010	2,1009
	2,1215
Cuarta lectura: 09/12/2010	2,0782
	2,0601
Quinta lectura: 10/03/2011	1,5334
	1,5213
Sexta lectura: 10/03/2011	1,5727
	1,5806
Séptima lectura: 10/03/2011	1,5081
	1,488

Lecturas Fe	Üea (5,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	-----
	4,738
Segunda lectura: 29/10/2010	4,8945
	4,8797
Tercera lectura: 03/11/2010	4,9064
	4,8718
Cuarta lectura: 09/12/2010	4,7745
	4,8159
Quinta lectura: 10/03/2011	4,7229
	4,83
Sexta lectura: 10/03/2011	4,7507
	4,8211
Séptima lectura: 10/03/2011	4,8505
	4,7803

Lecturas Fe	üM1. Ab (1,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	0,6664
	0,6604
Segunda lectura: 29/10/2010	-----

Tercera lectura: 03/11/2010	0,7174
	0,7021
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,6785
	0,6806
Quinta lectura: 10/03/2011	0,914
	0,904
Sexta lectura: 10/03/2011	0,9606
	0,9509
Séptima lectura: 10/03/2011	0,774
	0,783

Lecturas Fe	üM1. Aa (5,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	4,6408
	4,6953
Segunda lectura: 29/10/2010	4,6408

Tercera lectura: 03/11/2010	4,791

Cuarta lectura: 09/12/2010	4,6766
	4,6883
Quinta lectura: 10/03/2011	4,6899
	4,7049
Sexta lectura: 10/03/2011	4,7311
	4,7291
Séptima lectura: 10/03/2011	4,6941
	4,7031

Lecturas Fe	üM1
Primera lectura: 27/10/2010	0,2785
	0,2939
Segunda lectura: 29/10/2010	0,0053
	0,0067
Tercera lectura: 03/11/2010	0,1071
	0,0789
Cuarta lectura: 09/12/2010	-0,0245
	0,0042
Quinta lectura: 10/03/2011	0,1347
	0,1437
Sexta lectura: 10/03/2011	0,1627
	0,1608
Séptima lectura: 10/03/2011	-0,0323
	-0,0343

• Cobre

Lecturas Cu	Übk
Primera lectura: 27/10/2010	-0,0309
	-0,0309
Segunda lectura: 29/10/2010	-0,1512
	-0,1512
Tercera lectura: 03/11/2010	0,0464
	0,0472
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,0933
	0,0151
Quinta lectura: 10/03/2011	-0,068
	-0,068
Sexta lectura: 10/03/2011	-0,0746
	-0,0752
Séptima lectura: 10/03/2011	-0,0747
	-0,0766

Lecturas Cu	Üeb (0,5 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	0,5331
	0,5029
Segunda lectura: 29/10/2010	0,4656
	0,5876
Tercera lectura: 03/11/2010	0,4511
	0,4282
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,4511
	0,4282

Lecturas Cu	Üem (1,5 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	1,4566
	1,4392
Segunda lectura: 29/10/2010	1,5135
	1,4898
Tercera lectura: 03/11/2010	1,9112
	1,9088
Cuarta lectura: 09/12/2010	1,4884
	1,4499
Quinta lectura: 10/03/2011	1,7267
	1,7309
Sexta lectura: 10/03/2011	1,7346
	1,7448
Séptima lectura: 10/03/2011	1,8677
	1,8285

Lecturas Cu	Üea (3,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	2,9187
	2,8697
Segunda lectura: 29/10/2010	3,1406
	3,0955
Tercera lectura: 03/11/2010	3,7377
	3,7146
Cuarta lectura: 09/12/2010	2,1847
	2,0735
Quinta lectura: 10/03/2011	3,2348
	3,2463
Sexta lectura: 10/03/2011	3,2202
	3,2419
Séptima lectura: 10/03/2011	3,251
	3,2286

Lecturas Cu	üM1
Primera lectura: 27/10/2010	0,0194
	0,0033
Segunda lectura: 29/10/2010	-0,0786
	-0,0992
Tercera lectura: 03/11/2010	0,0823
	0,0823
Cuarta lectura: 09/12/2010	-0,104
	-0,1466
Quinta lectura: 10/03/2011	-0,0299
	-0,0305
Sexta lectura: 10/03/2011	-0,0336
	-0,0336
Séptima lectura: 10/03/2011	-0,0268
	-0,0268

Lecturas Cu	üM1. Ab (1,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	0,7779
	0,7631
Segunda lectura: 29/10/2010	0,7415
	0,7255
Tercera lectura: 03/11/2010	0,9919
	0,9824
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,9893
	0,9165
Quinta lectura: 10/03/2011	0,7654
	0,7703
Sexta lectura: 10/03/2011	0,7815
	0,7773
Séptima lectura: 10/03/2011	0,76
	0,7469

Lecturas Cu	üM1. Aa (3,0 mg/L)
Primera lectura: 27/10/2010	2,0187
	2,0153
Segunda lectura: 29/10/2010	-----

Tercera lectura: 03/11/2010	2,524
	2,5248
Cuarta lectura: 09/12/2010	2,0446
	2,035
Quinta lectura: 10/03/2011	2,187
	2,2003
Sexta lectura: 10/03/2011	2,1912
	2,222
Séptima lectura: 10/03/2011	2,3155
	2,277

Lecturas Cu	ron 0,5 mg/L
Primera lectura: 27/10/2010	0,513
	0,4996
Segunda lectura: 29/10/2010	0,5015
	0,4748
Tercera lectura: 03/11/2010	0,6783
	0,6791
Cuarta lectura: 09/12/2010	0,498
	0,4697
Quinta lectura: 10/03/2011	0,6243
	0,6273
Sexta lectura: 10/03/2011	0,6255
	0,6315
Séptima lectura: 10/03/2011	0,6462
	0,6343

Lecturas Cu	ron 3 mg/L
Primera lectura: 27/10/2010	2,4747
	2,4351
Segunda lectura: 29/10/2010	2,6637
	2,6064
Tercera lectura: 03/11/2010	3,0076
	3,0148
Cuarta lectura: 09/12/2010	1,955
	2,0133
Quinta lectura: 10/03/2011	2,3348
	2,3493
Sexta lectura: 10/03/2011	2,466
	2,4449
Séptima lectura: 10/03/2011	2,4642
	2,4175

ANEXO 5. Lecturas de Aguardiente

- Hierro

Lecturas Fe	blanco
Primera lectura: 07/06/2011	0,0365
	0,0385
Segunda lectura: 07/06/2011	0,0347
	0,0384
Tercera lectura: 09/06/2011	-0,0129
	-0,003
Cuarta lectura: 13/06/2011	0,1457
	0,0971
Quinta lectura: 13/06/2011	0,0881
	0,0927

Lecturas Fe	0.5 mg/L
Primera lectura: 07/06/2011	0,6193
	0,6366
Segunda lectura: 07/06/2011	0,6692
	0,6801
Tercera lectura: 09/06/2011	0,8241
	0,8142
Cuarta lectura: 13/06/2011	0,8894
	0,8948
Quinta lectura: 13/06/2011	0,8721
	0,8703

Lecturas Fe	1 mg/L
Primera lectura: 07/06/2011	1,0443
	1,0616
Segunda lectura: 07/06/2011	1,0403
	1,0056
Tercera lectura: 09/06/2011	1,1347
	1,1674
Cuarta lectura: 13/06/2011	1,1555
	1,152
Quinta lectura: 13/06/2011	1,1347
	1,1292

Lecturas Fe	2 mg/L
Primera lectura: 07/06/2011	2,1213
	2,0845
Segunda lectura: 07/06/2011	2,1648
	2,1446
Tercera lectura: 09/06/2011	2,3773
	2,3733
Cuarta lectura: 13/06/2011	2,2643
	2,2041
Quinta lectura: 13/06/2011	2,2281
	2,2409

Lecturas Fe	3 mg/L
Primera lectura: 07/06/2011	3,0963
	3,0578
Segunda lectura: 07/06/2011	3,1338
	3,1685
Tercera lectura: 09/06/2011	3,1519
	3,139
Cuarta lectura: 13/06/2011	3,1519
	3,1294
Quinta lectura: 13/06/2011	3,2446
	3,1773

Lecturas Fe	5 mg/L
Primera lectura: 07/06/2011	4,9291
	4,8483
Segunda lectura: 07/06/2011	4,7921
	4,8579
Tercera lectura: 09/06/2011	4,6863
	4,714
Cuarta lectura: 13/06/2011	4,7262
	4,7787
Quinta lectura: 13/06/2011	4,7196
	4,7123

Lecturas Fe	Blanco aguard.
Primera lectura: 07/06/2011	0,1019
	0,1039
	0,0846
Segunda lectura: 07/06/2011	0,1039
	0,0923
	0,0923
Tercera lectura: 09/06/2011	0,0673
	0,0673
	0,0584
Cuarta lectura: 13/06/2011	0,0989
	0,0845
	0,0854
Quinta lectura: 13/06/2011	0,022
	0,0119
	0,0129

Lecturas Fe	adición (1,0 mg/L)
Primera lectura: 07/06/2011	1,5097
	1,5232
	1,5366
Segunda lectura: 07/06/2011	1,6251
	1,6116
	1,6039
Tercera lectura: 09/06/2011	1,6759
	1,6155
	1,6442
Cuarta lectura: 13/06/2011	1,6996
	1,6879
	1,715
Quinta lectura: 13/06/2011	1,6561
	1,691
	1,7103

Lecturas Fe	adición (3,0 mg/L)
Primera lectura: 07/06/2011	2,5367
	2,4847
	2,5328
Segunda lectura: 07/06/2011	2,7059
	2,7713
	2,7424
Tercera lectura: 09/06/2011	2,7235
	2,7067
	2,682
Cuarta lectura: 13/06/2011	2,7158
	2,7643
	2,749
Quinta lectura: 13/06/2011	2,699
	2,7174
	2,7669

- Cobre

Lecturas Cu	blanco
Primera lectura: 30/05/2011	-0,0277
	-0,0284
Segunda lectura: 01/06/2011	-0,0368
	-0,0362
Tercera lectura: 07/06/2011	0,0018
	0,0006
Cuarta lectura: 07/06/2011	0,0119
	0,0131
Quinta lectura: 09/06/2011	-0,0175
	-0,0175

Lecturas Cu	0.5 mg/L
Primera lectura: 30/05/2011	0,4948
	0,4917
Segunda lectura: 01/06/2011	0,4921
	0,4934
Tercera lectura: 07/06/2011	0,5145
	0,5072
Cuarta lectura: 07/06/2011	0,5012
	0,4952
Quinta lectura: 09/06/2011	0,5103
	0,4975

Lecturas Cu	1 mg/L
Primera lectura: 30/05/2011	1,0274
	1,0011
Segunda lectura: 01/06/2011	1,0363
	1,0484
Tercera lectura: 07/06/2011	0,9798
	0,9726
Cuarta lectura: 07/06/2011	0,9798
	0,9762
Quinta lectura: 09/06/2011	0,9821
	0,9941

Lecturas Cu	1,5 mg/L
Primera lectura: 30/05/2011	1,4935
	1,491
Segunda lectura: 01/06/2011	1,5257
	1,5155
Tercera lectura: 07/06/2011	1,5083
	1,4937
Cuarta lectura: 07/06/2011	1,5107
	1,4976
Quinta lectura: 09/06/2011	1,5162
	1,5226

Lecturas Cu	2 mg/L
Primera lectura: 30/05/2011	2,0562
	2,0562
Segunda lectura: 01/06/2011	2,0246
	1,9998
Tercera lectura: 07/06/2011	2,0149
	2,0197
Cuarta lectura: 07/06/2011	2,0107
	1,9976
Quinta lectura: 09/06/2011	2,0419
	2,0327

Lecturas Cu	3 mg/L
Primera lectura: 30/05/2011	2,9484
	2,9421
Segunda lectura: 01/06/2011	2,9735
	2,9633
Tercera lectura: 07/06/2011	2,9917
	2,9953
Cuarta lectura: 07/06/2011	2,9988
	3,0071
Quinta lectura: 09/06/2011	2,9748
	2,9628

Lecturas Cu	Blanco Aguard.
Primera lectura: 30/05/2011	-0,0233
	-0,0227
Segunda lectura: 01/06/2011	-0,0362
	-0,0362
Tercera lectura: 07/06/2011	-0,0018
	-0,0018
Cuarta lectura: 07/06/2011	0
	0,0131
Quinta lectura: 09/06/2011	-0,0189
	-0,0189

Lecturas Cu	adición (1,0 mg/L)
Primera lectura: 30/05/2011	1,0042
	0,9904
Segunda lectura: 01/06/2011	0,9821
	0,9706
Tercera lectura: 07/06/2011	1,0307
	1,0392
Cuarta lectura: 07/06/2011	1,0463
	1,0416
Quinta lectura: 09/06/2011	1,0558
	1,0424

Lecturas Cu	adición (3,0 mg/L)
Primera lectura: 30/05/2011	2,9427
	2,9076
Segunda lectura: 01/06/2011	2,9614
	2,9142
Tercera lectura: 07/06/2011	2,982
	3,005
Cuarta lectura: 07/06/2011	2,9644
	2,9905
Quinta lectura: 09/06/2011	2,972
	2,9769