



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y
CUANTITATIVA DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS: UN
ENFOQUE DOCENTE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: QUÍMICO

PRESENTA: LUIS ENRIQUE ALCÁNTARA MANJARREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO**

VOCAL: **Profesor: JOAQUÍN PREZA DE LA VEGA**

SECRETARIO: **Profesor: ELIZABETH REYES LÓPEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: IRAN OCAÑA RÍOS**

2° SUPLENTE: **Profesor: IRMA CRUZ GAVILÁN GARCÍA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Edificio A, 2° Piso
Laboratorio Anexo 2-D.**

ASESOR DEL TEMA: DRA. NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. IRMA CRUZ GAVILÁN GARCÍA

SUSTENTANTE: LUIS ENRIQUE ALCÁNTARA MANJARREZ

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por los conocimientos y valores adquiridos durante mi formación académica y personal, siempre tendré presente todo lo que aprendí gracias a ella.

A mi Familia, por ser el gran motor de mi vida y su apoyo incondicional a lo largo de este camino.

A la Dra. Norma Ruth López Santiago por su gran y constante apoyo, dedicación, orientación y dirección a lo largo del servicio social y tesis.

A la Dra. Irma Cruz Gavilán García por su gran apoyo, consejos, recibimiento para realizar este trabajo.

A los miembros del Jurado, por sus grandes aportaciones durante la revisión y evaluación de este trabajo.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por la beca otorgado para la realización de este trabajo a través del proyecto PE201618 “Enseñanza de la validación de métodos analíticos”.

Contenido

Listado de tablas.....	vi
Listado de figuras	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen	ix
Introducción	x
Objetivos.....	xi
Objetivo general	xi
Objetivos particulares	xi
I. Marco teórico	1
1 La industria de bebidas alcohólicas.....	1
1.1 Tipo de bebidas alcohólicas	1
1.2 Bebidas fermentadas.....	2
1.3 Bebidas destiladas.....	3
1.4 Regulación de las bebidas alcohólicas	5
2 Análisis de las bebidas alcohólicas	7
2.1 Análisis generales de las bebidas alcohólicas	7
2.2 Análisis de metanol.....	9
3 La validación de métodos analíticos.....	13
3.1 Importancia de la validación de métodos analíticos.....	13
3.1.1 Nivel industrial.....	14
3.2 Enseñanza de la validación de métodos analíticos	15
3.3 Validación de métodos analíticos	16
3.3.1 Validación de métodos cualitativos	16
3.3.2 Validación de métodos cuantitativos	17
II. Marco metodológico	19
4 Estrategia de trabajo	19
4.1 Etapa I. Investigación documental	19
4.2 Etapa II. Validación de las metodologías seleccionadas	20
4.3 Etapa III. Aplicación	21
III. Resultados y discusión	22

5	Etapa I. Investigación documental.....	22
6	Etapa II. Validación de las metodologías seleccionadas de validación	24
6.1	Escritura de los protocolos (PNT) a validar de la metodología cualitativa y cuantitativa	24
6.2	Plan de validación.....	25
6.3	Resultados del trabajo experimental de validación.....	27
6.3.1	Desarrollo, adecuación y optimización de la determinación cualitativa de metanol	27
6.4	Informe de validación.....	34
7	Etapa III. Aplicación de enseñanza	35
7.1	Herramientas docentes.....	35
7.2	Prueba piloto en grupo	39
IV.	Conclusiones	41
	Bibliografía.....	42
	Anexo I. Portafolio de evidencias. Método cualitativo.....	48
	Anexo II. Portafolio de evidencias. Método cuantitativo.....	62
	Anexo III. Notas de apoyo docente.....	78

Listado de tablas

Tabla 1. Límites máximos permitidos de productos secundarios en etanol para la elaboración de bebidas alcohólicas	7
Tabla 2. Especificaciones de las bebidas alcohólicas	7
Tabla 3. Especificaciones de las bebidas alcohólicas fermentadas.....	7
Tabla 4. Análisis generales de las bebidas alcohólicas	9
Tabla 5. Análisis FODA el método colorimétrico del ácido cromotrópico para la determinación de metanol.....	23
Tabla 6. Descripción de los componentes del protocolo.....	26
Tabla 7. Tasas de falsos positivos y de falsos negativos.....	28
Tabla 8. Valores de los parámetros de validación	28
Tabla 9. Límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC)	32
Tabla 10. Repetibilidad	32
Tabla 11. Reproducibilidad	33
Tabla 12. Parámetros de desempeño de la determinación cuantitativa de metanol	33
Tabla 13. Características de las muestras.....	37
Tabla 14. Resultados de la aplicación a muestras.....	38

Listado de figuras

Figura 1. Clasificación de las bebidas alcohólicas.....	1
Figura 2. Metabolización de glucosa hasta la obtención de alcohol por el proceso de fermentación alcohólica	2
Figura 3. Mecanismo de acción de las pectinasas	3
Figura 4. Alambiques para destilación a escala casera e industrial.....	4
Figura 5. Oxidación de metanol a formaldehído	10
Figura 6. Propuesta de mecanismo entre el formaldehído (FA) y el ácido cromotrópico (AC).....	11
Figura 7. Diagrama de la metodología del método cualitativo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas	12
Figura 8. Diagrama de la metodología del método cuantitativo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas.....	12
Figura 9. Espectros VIS de productos de reacción de formaldehído (FA) y acetaldehído (AA) con ácido cromotrópico (AC).....	13
Figura 10. Contenido general de la metodología	19
Figura 11. Concentración de corte de la prueba cualitativa de identificación de metanol.....	28
Figura 12. Aplicación a muestras método cualitativo	29
Figura 13. Curva de calibración general Absorbancia vs Concentración.....	30
Figura 14. Elaboración de la curva de calibración para enseñanza en el grupo de Analítica Experimental III	31
Figura 15. Aplicación a muestras método cuantitativo (ordenadas conforme a la tabla 14).....	38

Abreviaturas

Abs: Absorbancia

AA: Acetaldehído

AC: Ácido cromotrópico

BA: Bebidas alcohólicas

Cc: Concentración de corte

CNQFBM: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México

DER: Desviación estándar relativa

ED: Especificidad diagnóstica

FA: Formaldehído

GC-MS: Gas chromatography–mass spectrometry / Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)

H₃SO₄: Ácido Sulfúrico

HPLC: High performance liquid chromatography / Cromatografía líquida de alta eficacia (por sus siglas en inglés)

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry / Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés)

KMnO₄: Permanganato de potasio

LDC: Límite de cuantificación

LDD: Límite de detección

MetOH: Metanol

NaHSO₃: Bisulfito de sodio

PNT: Protocolo normalizado de trabajo

SD: Sensibilidad diagnóstica

TFN: Tasa de falsos

TFP: Tasa de falsos positivos

UV/VIS: Ultravioleta/visible

VMA: Validación de métodos de analíticos

Resumen

En este trabajo se presentan como propuestas de proyecto de validación para un curso experimental universitario los métodos de determinación de metanol en bebidas alcohólicas, abordadas desde los enfoques: cualitativo y cuantitativo.

Los resultados obtenidos durante la validación de cada uno de ellos mostraron que, las metodologías presentadas son viables para poder emplearlas en la enseñanza de validación de métodos analíticos de una forma que sea accesible, eficiente, económica, que incluya la enseñanza de la documentación y registros científicos propios del tema, contiene la experiencia de los cálculos, de la integración y aplicación de los conocimientos en un laboratorio donde se valida un método analítico acuerdo con la normatividad o necesidades que cubran ampliamente las necesidades de un laboratorio que cuente con certificación (ISO 9001) o acreditación (ISO 17025).

Los protocolos propuestos se probaron frente a un grupo de alumnos en la materia de Analítica Experimental III que se imparte en la Facultad de Química-UNAM, en los semestres 2019-2 y 2020-1. Estos protocolos permiten que los estudiantes adquieran los conocimientos para validar un método a partir de la generación de un protocolo del método analítico a validar, la elaboración de un plan de validación, la elaboración de registros en bitácora en medios electrónicos u hojas de cálculo validadas, y la generación de un informe de validación, así como la aplicación a muestras.

Introducción

Hoy por hoy, bajo la hegemonía de un mundo globalizado es imperativo el asegurar la concordancia de los resultados de análisis dada la repercusión que tendrán en la toma de decisiones que pudieran impactar en aspectos como la calidad de un producto, servicio o proyecto, la mayoría de las actividades industriales, científicas y académicas, demandan resultados de medición confiables para la toma de decisiones (Chauvel et al, 2002, López-Santiago & Orta-Pérez, 2012).

En los laboratorios públicos o privados, las actividades de análisis son llevadas a cabo por profesionales de la química, es por esto que, en el campo laboral los contratantes solicitan egresados cada vez más competentes para afrontar proyectos que requieren llevar a cabo mediciones constantes, en particular, aquellas que ostentan certificaciones y/o acreditaciones, tales como laboratorios farmacéuticos, del sector alimentario, de análisis clínicos, análisis ambiental, etc. (Woodget, 2003; López-Santiago & Orta-Pérez, 2012). Bajo esta perspectiva, el reto de la enseñanza universitaria en materia de validación de métodos de analíticos (VMA) exige que las metodologías docentes se ajusten a formar profesionales que puedan responder a las demandas laborales (López-Santiago & Orta-Pérez, 2012).

Este trabajo se presenta como propuesta de un proyecto de validación en un curso experimental universitario denominado “Determinación de metanol en bebidas alcohólicas”, abordada desde dos enfoques el cualitativo y el cuantitativo. Dentro de este proyecto se trabaja en metodologías docentes que permiten la formación de profesionales que puedan responder a los nuevos retos y demandas laborales. Uno de sus objetivos es el montaje de metodologías analíticas vigentes que permitan enseñar de forma eficiente los conceptos básicos de la validación de métodos analíticos aplicables a cualquier sector de la química, bajo escenarios de laboratorios que deben validar un método analítico y deben documentar con evidencia objetiva toda la validación de acuerdo con la normatividad o necesidades que se desean satisfacer y que cubren ampliamente las necesidades de un laboratorio que cuente con certificación (ISO 9001) o acreditación (ISO 17025).

Objetivos

Objetivo general

Establecer desde un enfoque docente la validación de los protocolos de determinación cualitativa y cuantitativa de metanol en bebidas alcohólicas.

Objetivos particulares

1. Identificar los métodos analíticos de determinación cuantitativa y cualitativa de metanol en bebidas alcohólicas plausibles de validar un curso curricular.
2. Establecer los protocolos normalizados de trabajo de la determinación cuantitativa y cualitativa de metanol en bebidas alcohólicas plausibles de validar un curso curricular.
3. Detallar y validar los protocolos de determinación cualitativa y cuantitativa de metanol en bebidas alcohólicas.
4. Determinar los resultados tipo de la aplicación de los protocolos validados al análisis de muestras de bebidas alcohólicas.
5. Evaluar proyectos de validación cuantitativos y cualitativos en la materia de Análítica Experimental III (1802) de la carrera de Química de la Facultad de Química de la UNAM.

I. Marco teórico

1 La industria de bebidas alcohólicas

La industria de las bebidas alcohólicas es una de las de más grandes con mayor demanda y desarrollo a nivel mundial. Además, emplea a varios millones de personas en todo el mundo (Ward, 1998), de tal manera que su estudio resulta de gran importancia debido a que es considerada desde un punto de vista económico una de las industrias más importantes debido al gran número de fabricantes, métodos de envasado, procesos de producción, insumos, materias primas y productos finales que tiene.

1.1 Tipo de bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas pueden ser agrupadas de acuerdo con las materias primas con las que se elaboran tal como se muestra en la Figura 1.

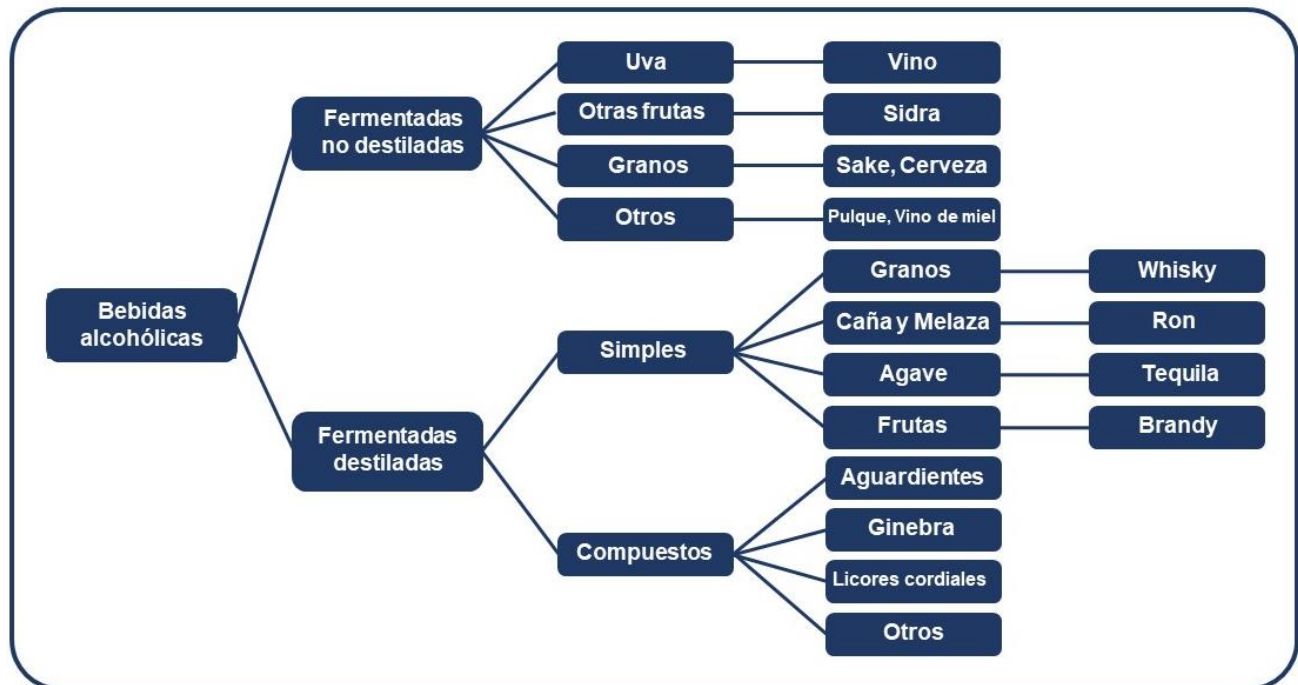


Figura 1. Clasificación de las bebidas alcohólicas
Tomado de: (Microlab Industrial, 2019)

Las bebidas alcohólicas, se pueden dividir por un lado en bebidas fermentadas, como el vino, que de acuerdo a su edad pueden ser jóvenes, de crianza, de reserva, y de gran reserva, la cerveza, que a su vez puede ser de fermentación alta o baja, y por otro lado; en bebidas destiladas, como el whisky, el brandy, el tequila etc...., que se preparan básicamente mezclando mostos o extractos de frutas, frutos secos u otros productos alimenticios (Ward, 1998).

1.2 Bebidas fermentadas

Las bebidas fermentadas son aquellas que se producen a través de un proceso de fermentación, ya sea de cereales, frutas y/o vegetales. De tal forma que, la fermentación es, entonces, el proceso químico que se da al dejar reposar cualquiera de estos ingredientes (cereales, frutas y/o vegetales) con un alto contenido de glucosa durante periodos largos y a determinadas temperaturas dependiendo de la bebida de que se trate. (Microlab Industrial, 2019; Quiroga-Fernández, 2016).

En este sentido, la fermentación alcohólica es entonces, un proceso catabólico de oxidación incompleta en el que una molécula orgánica (hidratos de carbono) es transformada en moléculas más simples (etanol + CO₂), esto se debe gracias a la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos conocidos como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores, Este proceso ocurre sin necesidad de oxígeno por lo que se trata de un proceso anaeróbico (Delgado-Vellosillo, 2020), este proceso se muestra en la Figura 2.

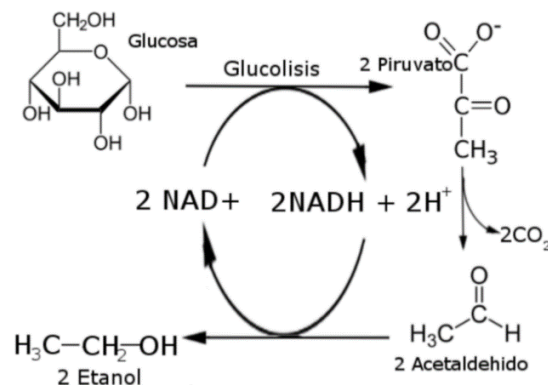


Figura 2. Metabolización de glucosa hasta la obtención de alcohol por el proceso de fermentación alcohólica

Tomada de: (Ruiz, 2019)

La fermentación alcohólica no produce metanol, este proviene de la hidrólisis de las pectinas (pectinas solubles y propectinas), de las materias primas vegetales que se fermentan. La pectina que es una cadena de núcleos galacturónicos (ácido péctico), se esterifica con el alcohol metílico, por esta razón, la fermentación se acompaña de la hidrólisis de este éster, donde se libera el metanol y el ácido péctico se insolubiliza. Por lo tanto, el contenido de metanol está en función del contenido de pectinas de la materia prima vegetal que se fermenta (Secretaría de salud, 1995).

Las pectinas son heteropolisacáridos que se presentan en la naturaleza como elementos estructurales del sistema celular de las plantas. Su componente principal es el ácido galacturónico, que existe parcialmente esterificado con metanol. Se encuentran principalmente en las frutas y vegetales (Herbstreith & Fox, 2001).

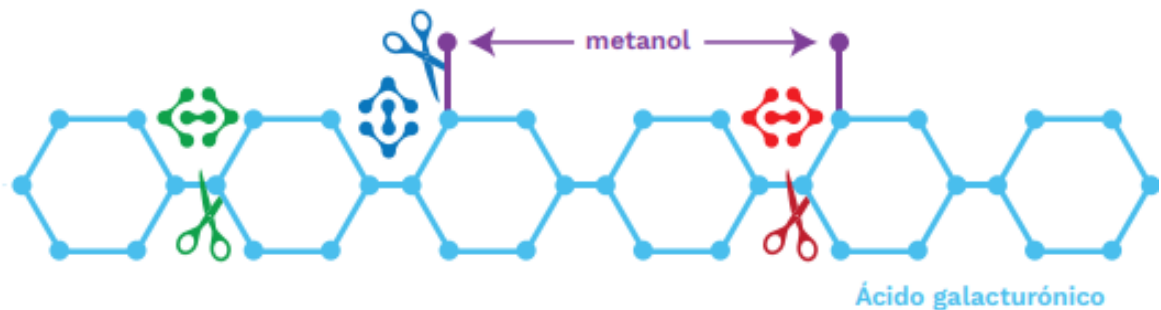


Figura 3. Mecanismo de acción de las pectinasas
Tomada de: (AGROVIN, 2021)

1.3 Bebidas destiladas

Las bebidas alcohólicas destiladas son aquellas que se obtienen a partir de la destilación, el objetivo de esta técnica es separar a los componentes de los mostos fermentados aprovechando los diferentes puntos de ebullición estos pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación (Microlab Industrial, 2019).

La destilación en su forma más tradicional implica calentar el líquido fermentado dentro de un recipiente cerrado hasta que el alcohol (con un punto de ebullición menor al del agua) se evapore. Las gotas de alcohol se concentrarán al centro del techo del recipiente y se condensarán escurriendo por un tubo hacia otro recipiente.

De esa forma, el nuevo recipiente contendrá alcohol de mayor pureza, dejando atrás agua y otros compuestos. Conforme más avance la destilación, más agua comenzará a pasar, reduciendo el porcentaje de alcohol (Quiroga-Fernández, 2016).

La destilación azeotrópica es una de las técnicas usadas para romper un azeótropo en la destilación. Una de las destilaciones más comunes con un azeótropo es la de la mezcla etanol-agua. Usando técnicas normales de destilación, el etanol sólo puede ser purificado a aproximadamente el 95%.

Normalmente la fracción recolectada es demasiado rica en metanol, por lo que se requiere una segunda o una tercera destilación (conocida como rectificación o desmetilación) para reducir el contenido de metanol dentro de las especificaciones legales, de esta manera se asegura obtener alcoholes más puros para una bebida delicada con un porcentaje alcohólico definido (Silva, 2000).

Si los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla sólo difieren ligeramente, no se puede conseguir la separación total en una destilación individual. Si se hierva una mezcla de estos dos líquidos, el vapor que sale es más rico en alcohol y más pobre en agua que el líquido del que procede, pero no es alcohol puro. Cuando para obtener una determinada concentración se requiere efectuar una serie de destilaciones sucesivas, se conoce la operación como destilación fraccionada (Hermoso Domínguez, 2021).



Figura 4. Alambiques para destilación a escala casera e industrial
Tomada de: (Microlab Industrial, 2019)

1.4 Regulación de las bebidas alcohólicas

Las autoridades sanitarias analizan que las calidades de las bebidas alcohólicas cumplan con las especificaciones señaladas en la NOM-142-SSA1/SCFI-2014 Bebidas Alcohólicas. Especificaciones Sanitarias. Etiquetado Sanitario y Comercial, así como en el Artículo 206 de la Ley General de Salud, en el cual se considera adulterado a cualquier producto cuando: "...su naturaleza y composición no correspondan a aquellas con que se etiqüete, anuncie, expendá, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización o haya sufrido tratamiento que disimule su alteración, se encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas..." (Pérez-Vega, Fernández-Fernández, & Ramírez-Peña, 2015; López-Naranjo, Godínez-García, Flores-Hernández, Altagracia-Martínez, & Córdova-Moreno, 2013)

Las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) describen en sus distintos apartados, varios aspectos, tales como las definiciones de las diversas bebidas alcohólicas comerciales, su añejamiento y maduración, sí es una bebida alcohólica destilada o fermentada, los límites máximos permitidos de aditivos, microorganismos y metales entre otros (Secretaría de salud, 1995).

Las bebidas alcohólicas pueden ser producidas industrialmente en grandes cantidades o en menores proporciones de manera clandestina e improvisada por pequeños productores. Estas presentan mayor probabilidad de tener la presencia de otros compuestos que no son etanol ni agua, sustancias que tienen su origen fundamentalmente como coproductos de la fermentación, o provenientes de la materia prima, como acompañantes o formados durante el proceso de destilación que permitan la disminución de los compuestos no deseados durante su elaboración (Marquina, 2018; Borroto-Mato, 2017).

Comúnmente este tipo de bebidas representa un menor gasto para el consumidor, no aseguran la calidad, ni la higiene en su elaboración y, al no existir un control en su proceso de producción genera graves riesgos para la salud de los consumidores (Pérez-Vega, Fernández-Fernández, & Ramírez-Peña, 2015), gracias a los distintos compuestos que se producen durante el proceso de una mala fermentación o que

podieron ser adicionados por el productor con diversos fines, las cuales tienen un efecto tóxico, estos compuestos integran la fracción aromática de las bebidas alcohólicas, son denominados congéneres. Los congéneres son compuestos químicos formados principalmente durante los procesos de fermentación y añejamiento, por la interacción química entre algunos ácidos orgánicos con el alcohol etílico para formar ésteres, los aldehídos, ácidos orgánicos, alcoholes superiores y furfural. Los congéneres se designan también con el nombre de impurezas volátiles y contribuyen a dar a la bebida alcohólica el sabor y aroma propios de la materia prima. Su concentración puede ser lo suficientemente elevada como para rendir un desagradable sabor y olor penetrante en el producto (Borroto-Mato, 2017).

Las dosis elevadas de estos compuestos provocan síntomas tales como: náusea, vómito, cefalea, dolor abdominal y perturbación visual, y pueden dejar como secuela ceguera irreversible y en algunas ocasiones la muerte. Además, la mayoría de los fabricantes tradicionales de alcohol desconocen la composición química del producto alcohólico que elaboran y en consecuencia pueden estar comercializando productos con compuestos dañinos para la salud (Rehm, Kanteres, & Lachenmeir, 2010; Borroto-Mato, 2017).

Por eso mediante una correcta rectificación de la bebida alcohólica se puede hablar de una sustancia apta para el consumo humano, pero en dicha rectificación se pierden también algunos ésteres volátiles y aceites esenciales que confieren el aroma respectivo a cada bebida. (Microlab Industrial, 2019).

Se muestran las especificaciones para las distintas bebidas alcohólicas en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Límites máximos permitidos de productos secundarios en etanol para la elaboración de bebidas alcohólicas

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
	Valores expresados en mg · 100 mL ⁻¹ de alcohol anhidro
Metanol	100.0
Aldehídos	30.0
Furfural	5.0
Alcoholes superiores	200.0

Fuente: (Secretaría de salud, 2014)

Tabla 2. Especificaciones de las bebidas alcohólicas (a excepción de las fermentadas)

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
	Valores expresados en mg · 100 mL ⁻¹ de alcohol anhidro
Metanol	300.0
Aldehídos	40.0
Furfural	5.0
Alcoholes superiores	500.0*

* El límite máximo de alcoholes superiores para el Whisky y el Cognac no debe exceder de 1000 mg/100 mL de alcohol anhidro.

Fuente: (Secretaría de salud, 2014)

Tabla 3. Especificaciones de las bebidas alcohólicas fermentadas

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
	Valores expresados en mg · 100 mL ⁻¹ de alcohol anhidro
Metanol	300.0

Fuente: (Secretaría de salud, 2014)

2 Análisis de las bebidas alcohólicas

2.1 Análisis generales de las bebidas alcohólicas

La composición de las bebidas alcohólicas es muy compleja. Las investigaciones han mostrado que un vasto número de compuestos son responsables de su olor y sabor característico, ya que durante el proceso de fermentación la levadura sintetiza un gran número de compuestos participantes en el aroma y el sabor siendo los más importantes los ésteres, alcoholes superiores, compuestos azufrados y compuestos

carbonílicos como los aldehídos. La levadura empleada y las condiciones de operación, tales como la temperatura, la concentración de oxígeno en el mosto, factores de contaminación, entre otros, influyen directamente en la producción de estos compuestos aromáticos, así como en la formación de otros compuestos como los fenoles y derivados azufrados (EcuRed, 2020).

Es de gran importancia de monitorear las sustancias presentes en las bebidas alcohólicas, para determinar su calidad, y así garantizar la confiabilidad para su venta y consumo del producto (Microlab Industrial, 2019).

El análisis de monitoreo brinda elementos importantes al productor como:

- Saber si la fermentación tuvo su rendimiento óptimo y si no, determinar los posibles factores que afectaron su proceso; si fue una contaminación cruzada, o si la temperatura de fermentación no es la adecuada.
- Conocer el perfil de aromas que caracteriza a la bebida, y garantizar la homogeneidad entre los productos finales.
- Realizar trámites para su venta al público en general y para su exportación.
- Garantizar la calidad de tu producto y que no ha sido adulterado.

Como distribuidor, punto de venta o consumidor el análisis puede ayudar a:

- Tener la garantía de compra/venta de un producto de calidad.
- Fundamentar en instancias legales, la causa de algún problema de salud causado por la ingesta del producto.

Los métodos analíticos que se apliquen para producir datos de composición química de alimentos deben ser apropiados, utilizar técnicas analíticas exactas y ser realizados por analistas entrenados.

Tabla 4. Análisis generales de las bebidas alcohólicas

PRUEBA	TÉCNICA/MÉTODO	REFERENCIA
Contenido Alcohólico a 20 °C (% Alc. Vol.)	Densímetro digital	NMX-V-013-NORMEX-2013
Determinación de extracto seco	Gravimétrico	NMX-V-017-NORMEX-2014
Determinación de aldehídos, metanol, ésteres y alcoholes superiores	Cromatografía de gases	NMX-V-005-NORMEX-2013
Determinación de furfural	Cromatografía de líquidos	NMX-V-004-NORMEX-2013
Determinación de azúcares reductores totales o azúcares	Volumétrico de Lane-Eynon o cromatografía de líquidos de alta resolución	NMX-V-006-NORMEX-2013
Determinación de metales pesados	Absorción atómica	NOM-117-SSA1-1994

Fuente: (Consejo regulador del tequila, 2019).

2.2 Análisis de metanol

En las bebidas alcohólicas el etanol y el metanol están presentes después de la destilación y prevalece significativamente el etanol, el cual se metaboliza principalmente por el cuerpo humano, sin embargo la presencia de metanol como subproducto es inherente dadas sus propiedad físico-químicas, y en este sentido, se estima que ocurren varios miles de intoxicaciones por metanol cada año en todo el mundo y muchas de ellas terminan en la muerte (Rehm, Kanteres, & Lachenmeir, 2010).

Por lo anterior, son necesarios métodos *ad hoc* que ayuden a determinar la cantidad de metanol presente en cada tipo de bebida alcohólica. Existen varias técnicas y métodos analíticos para hacerlo, las técnicas más comunes para determinar el contenido de metanol en el laboratorio son: cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y la colorimetría, de hecho el método colorimétrico de ácido cromotrópico es el método más utilizado para la determinación de metanol (recomendado como métodos

oficiales de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists (Wang, 2004; Vaskova, 2014),

La determinación de metanol por HPLC requiere un pretratamiento de la muestra con destilación, filtración por membrana y derivatización, que es un protocolo que requiere mucho tiempo. La espectroscopia de infrarrojo cercano es un método desarrollado recientemente para medir el contenido de metanol en muestras alcohólicas; sin embargo, establecer la curva de calibración lleva mucho tiempo y el método puede interferir con el etanol que lo acompaña (Wang, 2004).

En el método colorimétrico para determinar metanol reacciona con el permanganato de potasio para oxidarse a formaldehído. El tiempo de reacción entre el metanol y el permanganato de potasio puede afectar los resultados experimentales. Después de que el metanol se oxida a formaldehído, y dependiendo del tiempo que se deje la reacción permanganato de potasio oxida el formaldehído hasta ácido fórmico. Se debe agregar bisulfito de sodio para reaccione con el permanganato de potasio, para evitar que el formaldehído sea oxidado, por lo que debe determinarse el mejor momento para agregar bisulfito de sodio (Fu et al, 2019), esta oxidación se muestra en la Figura 4.

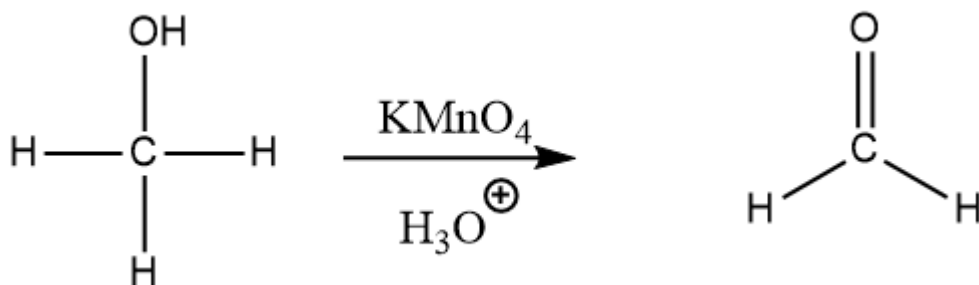


Figura 5. Oxidación de metanol a formaldehido

Elaboración propia

La química de la reacción de color entre el formaldehído y el ácido cromotrópico, en medios fuertemente ácidos implica un proceso de dos pasos, como se muestra en la Figura 5 (Fagnani, 2003)

El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico para producir un compuesto colorido violeta en condiciones ácidas. La absorbancia del compuesto alcanza su pico a 575 nm. La concentración de metanol se calcula a partir de la absorbancia utilizando una curva de calibración.

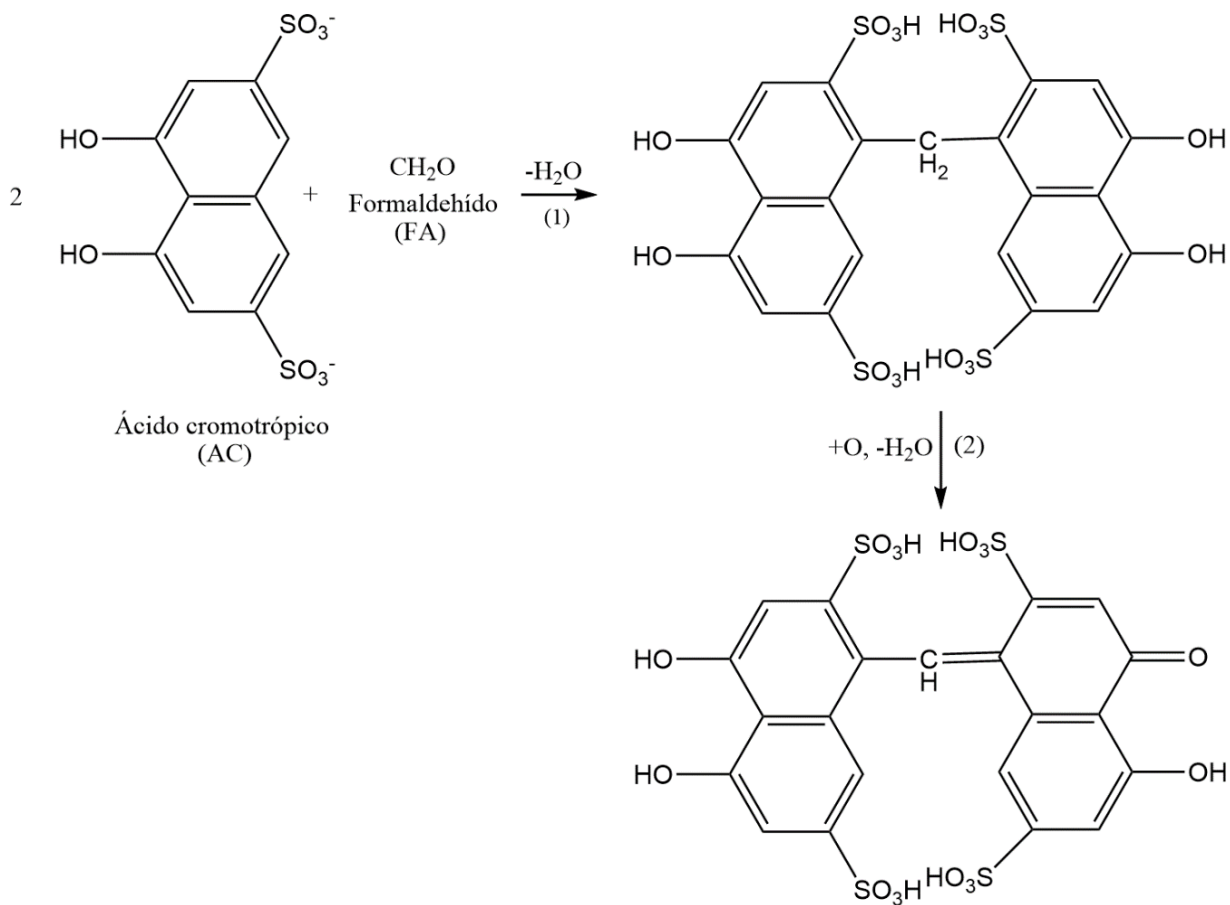


Figura 6. Propuesta de mecanismo entre el formaldehído (FA) y el ácido cromotrópico (AC)
Tomada de: **(Fagnani, 2003)**

La metodología seguida para la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol es presentada en las Figuras 7 y 8.

Método cualitativo

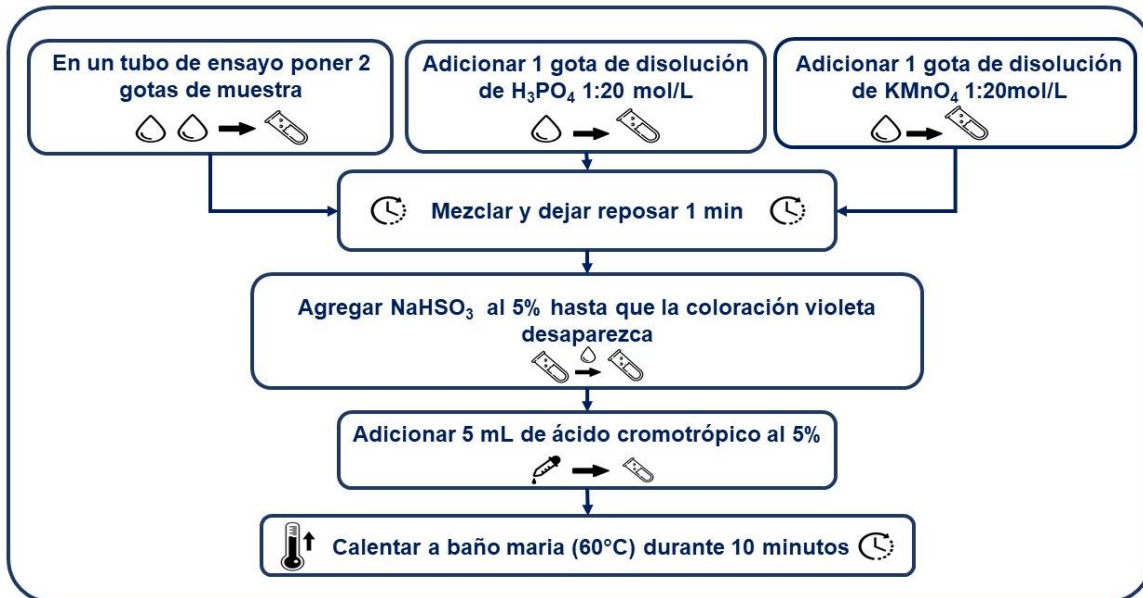


Figura 7. Diagrama de la metodología del método cualitativo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas

Elaboración propia

Método cuantitativo

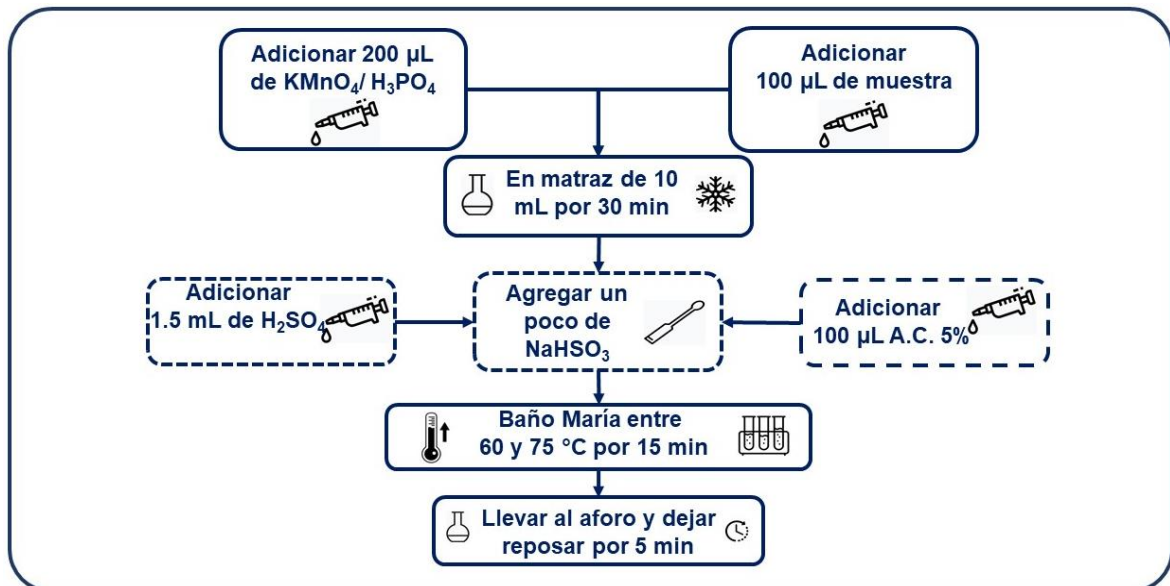


Figura 8. Diagrama de la metodología del método cuantitativo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas

Elaboración propia

No se encuentra reportada la existencia de alguna interferencia para este método, incluso si el acetaldehído se encuentra presente en un gran exceso (Jendral, Monakhova, & Lachenmeier, 2011)

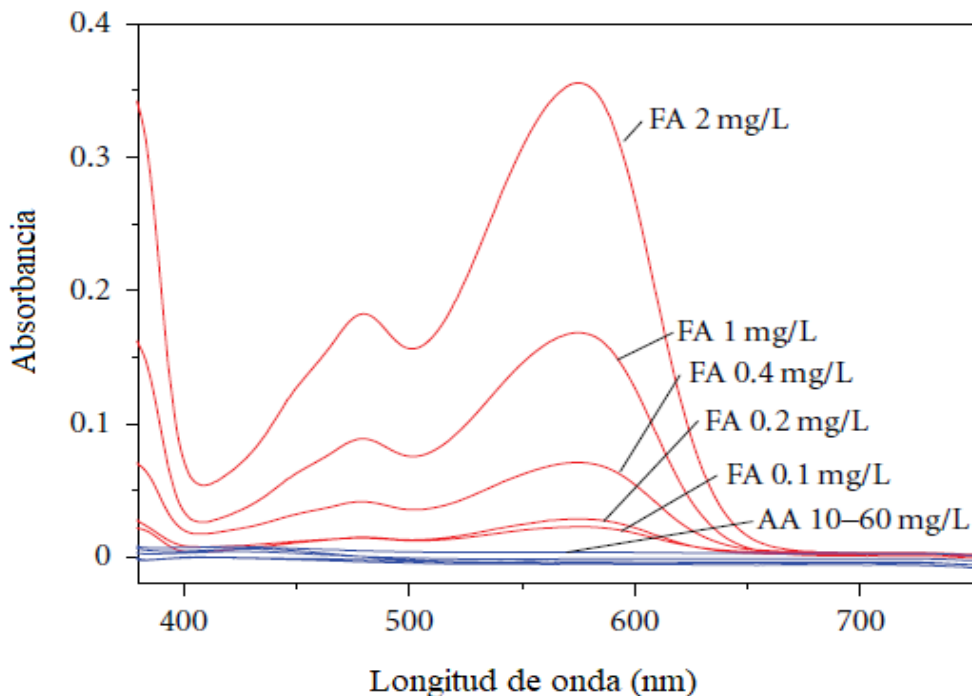


Figura 9. Espectros VIS de productos de reacción de formaldehído (FA) y acetaldehído (AA) con ácido cromotrópico (AC)

Tomado de: (Jendral, Monakhova, & Lachenmeier, 2011)

3 La validación de métodos analíticos

3.1 Importancia de la validación de métodos analíticos

Millones de pruebas, mediciones y exámenes se hacen cada día en miles de laboratorios de todo el mundo, sin embargo, los costos de llevar a cabo estas mediciones son elevados y pueden surgir costos adicionales con base en las decisiones tomadas a partir de los resultados, por ello, es importante hacer una correcta medición y ser capaz de demostrar que el resultado es correcto (Morillas, 2016).

En el trabajo científico, los resultados poco confiables pueden conducir a una sobreestimación o subestimación de los efectos, a interpretaciones falsas y a conclusiones injustificadas (Peters, 2007).

Si tales errores no son obvios, pueden pasar desapercibidos durante un estudio científico o investigación de caso. A menos que sea impugnado oficialmente por otros expertos en el campo, pueden multiplicarse dentro de la comunidad científica o convertirse en parte del conocimiento general aceptado en un área determinada de investigación y, por lo tanto, causar más interpretaciones erróneas.

Debido a la importancia de la validación de métodos en todo el campo de la química analítica, varias organizaciones y conferencias internacionales han publicado una serie de documentos de orientación sobre este tema, por ejemplo, la guía EURACHEM; guía de VMA del CNQFBM, por mencionar algunos.

De tal manera que, todos estos documentos son importantes y potencialmente útiles para cualquier validación de métodos (Peters, 2007), por esta razón, la validación es el proceso estable, mediante ciertos estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método a desarrollar, para asegurar que un objeto satisfaga los requisitos necesarios para un cierto uso para su aplicación analítica (CCAYAC, Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos, 2011).

El resultado de una validación debe ser expresada como que la herramienta cumple los requisitos para la función prevista, con una mención explícita a los requisitos y a la función, uso o aplicación, prevista (Lazos-Martínez & Hernández-Gutiérrez, 2004).

3.1.1 Nivel industrial

La validación de métodos analíticos es un elemento básico en los sistemas de calidad de los laboratorios de ensayo (clínicos, alimentos, microbiológicos, centros de investigación, etcétera), ya que al confirmar por medio de evidencias cumplen con los requisitos necesarios para un uso específico, donde se garantiza la calidad, la confianza y la seguridad de los resultados analíticos. (López, M:D:C, López Vidal, & Ramos Mayo, 2014)

La información analítica se puede utilizar para una variedad de propósitos: tomar decisiones que involucren el control del proceso de fabricación de un producto,

evaluar si un producto cumple con los límites reglamentarios, decisiones totales sobre asuntos legales, comercio internacional, problemas de salud o medio ambiente. En consecuencia, el productor de resultados analíticos no solo debe asegurarse de que sean confiables, sino también de que cuenten con todos los elementos que dan confianza al usuario. (Boqué, Maroto, Riu, & Xavier Rius, 2002)

3.2 Enseñanza de la validación de métodos analíticos

La International Union of Pure and Applied Chemistry (*IUPAC*) considera que por “validación de un método analítico” se debe entender al sistema analítico en su conjunto, bajo esta perspectiva la IUPAC indica que la validación se aplica a un protocolo definido, para la determinación de un analito especificado y en un intervalo de concentraciones en un tipo determinado de material de ensayo (matriz), y que se aplica para un propósito específico (Thompson, Ellison, & Wood, 2002).

Dentro del aula o el laboratorio es donde se ponen en práctica tanto las ideas como las estrategias educativas; la evaluación, el trabajo reflexivo y recomendaciones, y es ahí donde la repercusión de toda forma eslabón por eslabón la cadena educativa que la enseñanza (Rius de la Pola, 2011).

En la mancuerna de enseñanza–aprendizaje de la química analítica siempre se presentan oportunidades de mejora y retos, de diferentes tipos pueden ser pedagógicos, didácticos entre otros, no obstante, es necesario enfrentarlos y atenderlos, lo que implica un despliegue de diferentes habilidades docentes más allá de los preceptos teóricos (Ríos, Jaramillo, Gómez & Mesa, 2005).

En la asignatura Analítica experimental III la interpretación del programa de la misma es parte de la libertad de cátedra, para adquirir y fortalecer los conocimientos donde se introduce al desarrollo de métodos de análisis validados, empleando tanto las técnicas instrumentales de análisis fortalecen el propósito de un método analítico de la entrega de un resultado cualitativo y / o cuantitativo con un nivel de incertidumbre aceptable y se reconoce que la validación es necesaria en los laboratorios analíticos. De esta manera, el uso de métodos validados es importante para que un laboratorio analítico muestre su calificación y competencia (Taverniers, 2004).

3.3 Validación de métodos analíticos

Los datos de validación deben generarse bajo un protocolo aprobado por el patrocinador siguiendo las buenas prácticas de fabricación actuales con la descripción de la metodología de cada característica de validación y criterios de aceptación predeterminados y justificados, utilizando instrumentación calificada (Procedures, 2015).

El plan de validación debe cubrir todos los aspectos de la validación del método, desde la selección de las características de desempeño a evaluar hasta el análisis estadístico y la evaluación de los datos (Barwick, 2017).

3.3.1 Validación de métodos cualitativos

En los laboratorios de rutina, por ejemplo, es bastante habitual que la primera etapa determine si uno o más analitos están presentes / ausentes en una muestra y, de ser así, para el segundo paso estimar su nivel de concentración (Trullols, Ruisánchez, & Ruis, 2004).

Los métodos cualitativos proporcionan una respuesta binaria (sí/no, positivo/negativo, reactivo/no reactivo) para una concentración de corte dada de un analito, la respuesta positiva ocurre cuando se considera que está presente en la matriz de estudio una cantidad mínima detectable del analito de interés y por ello ha ocurrido una respuesta analítica y, una respuesta negativa ocurre cuando se considera que no está presente en la matriz de estudio el analito de interés o se encuentra en una cantidad inferior a la mínima detectable y por ello no ha ocurrido una respuesta analítica (Sánchez, 2010).

La validación supone la identificación de la concentración de corte para clasificar/diagnosticar una condición (Morillas, 2016). De esta manera, en lugar de tratar de cuantificar los contaminantes en la muestra como el primer objetivo, esto podría ser suficiente para asegurar si están presentes por encima o por debajo del nivel de concentración permitido.

Los métodos cualitativos se usan comúnmente como técnicas de detección antes de la cuantificación con el método de rutina, y eso permite reducir tanto el tiempo como el costo del análisis (Trullols, Ruisánchez, & Ruis, 2004).

La calidad de los resultados proporcionados por estos métodos cualitativos es de suma importancia. Los usuarios de estos métodos analíticos deben asegurarse de que los resultados obtenidos en su laboratorio sean adecuados para su propósito. La validación de un método cualitativo debe seguir el mismo rigor que la de un método cuantitativo (López-Santiago, Gavilán-García, & Flores-Avila, 2019).

La validación de un método no depende de que éste sea cuantitativo o cualitativo, ya que validar consiste en verificar y documentar su validez, su adecuación a unos requisitos previamente establecidos (Trullols, Ruisánchez, & Ruis, 2004).

Como consecuencia, hoy en día existen muchas pautas de validación que son aceptadas por organismos reguladores o por comunidades de profesionales en campos específicos, sin embargo, no hay una guía de validación general disponible para los métodos analíticos cualitativos. Esta revisión discute el estado del arte de la validación en métodos cualitativos.

Para los métodos cualitativos, el LDD se define como la "concentración umbral a la cual la prueba no es confiable". Cada serie de muestras en blanco, enriquecidas con diferentes concentraciones del analito, se analiza al menos 10 veces (Taverniers, 2004).

3.3.2 Validación de métodos cuantitativos

Un laboratorio acreditado o en proceso de acreditación debe demostrar que tiene la competencia técnica para desarrollar las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativo establecidos en su alcance de acreditación, y por otro, al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados (CENAM & EMA, 2008).

Los laboratorios que realizan estos ensayos trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad, tanto legal como social, que reclama un nivel de calidad y de confianza extraordinarios. Por ello, tanto los métodos de ensayo como los

laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico y técnico, la fiabilidad de los resultados. Esto implica que, además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables, con independencia del laboratorio que los ejecute. En este sentido, el empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías (Camaró-Sala, Catalá-Cuenca, Gimeno-Cardona, Olmos-Martínez, & Martínez-García, 2013).

II. Marco metodológico

4 Estrategia de trabajo

La estrategia planteada para el logro de los objetivos se muestra siguiente esquema:



Figura 10. Contenido general de la metodología

4.1 Etapa I. Investigación documental

El trabajo de revisión bibliográfica constituye una etapa fundamental de todo proyecto de investigación y debe garantizar la obtención de la información más relevante en el campo de estudio, de un universo de documentos que puede ser muy extenso (Aleixandre-Benavent, González Muñoz, Alonso-Arroyo, & González de Dios, 2011). Dado que en la actualidad se dispone múltiples formatos y fuentes de información científica, el problema radica en planificar el método de búsqueda de información de forma eficaz, estructurada y sistemática para localizar la bibliografía adecuada sobre el tema de estudio (Vilanova, 2012). Detalles en el apartado 5.

4.2 Etapa II. Validación de las metodologías seleccionadas

Para cada una de las metodologías seleccionadas se llevaron a cabo los siguientes pasos del proceso de validación:

Escritura de los protocolos (PNT) de la metodología cualitativa y cuantitativa

Un punto esencial para la poder llevar a cabo la validación de un método analítico es contar con un protocolo de trabajo establecido con claridad y que cumpla con los puntos requeridos, donde los estudiantes moldean el protocolo normalizado del método que van a validar (López-Santiago, Gavilán-García, & Flores-Avila, 2019).

Plan de validación

Otro punto esencial es contar con un plan de validación, para apoyar la adquisición de conocimiento en cuanto a los parámetros que deben obtener, donde los estudiantes colocan de forma sucinta los parámetros a obtener, la experimentación, los cálculos estadísticos a efectuar y los criterios de aceptación (López-Santiago, Gavilán-García, & Flores-Avila, 2019).

Manejo de resultados experimentales

Se solicita que los estudiantes elaboren su hoja de cálculo y la validen (tal como lo solicitan los criterios de las entidades acreditadoras en México), con la que manejarán sus resultados (López-Santiago, Gavilán-García, & Flores-Avila, 2019).

Informe de validación

Al final de semestre los estudiantes han completado su proyecto y el resultado es un método validado. Los resultados de la validación se plasman en el Informe de validación, el cual incluye apartados que permiten dejar claro el alcance, los parámetros evaluados y la conclusión, esto de acuerdo con la normatividad o necesidades, previamente fijadas, que se desean satisfacer (López-Santiago, Gavilán-García, & Flores-Avila, 2019).

4.3 Etapa III. Aplicación

Para darle el enfoque docente se abordaron las:

Herramientas docentes

Los protocolos normalizados de trabajo son documentos donde se muestra la calidad o nivel alcanzado en su profesión a través de la integración de una colección de sus trabajos más representativos o sobresalientes, fungen como un portafolios de evidencias son una selección o colección de trabajos académicos que los alumnos han realizado en el transcurso de un ciclo o curso escolar o con base en alguna dimensión temporal o ajustándose a un proyecto de trabajo dado. No es una colección al azar o de trabajos sin relación, por el contrario, muestra el crecimiento gradual y los aprendizajes logrados por los autores (Díaz-Barriga, Romero-Martínez, & Heredia-Sánchez, 2012).

Como a su vez proporcionar notas de apoyo para el docente, como los cuidados o puntos clave de cada método, estos pueden ser observados en el Anexo III.

Prueba piloto en grupo

Los protocolos propuestos se probaron frente a un grupo de alumnos en la materia de Analítica Experimental III que se imparte en la Facultad de Química-UNAM, en los semestres 2019-2 y 2020-1 y permiten que los estudiantes adquieran los conocimientos para validar un método a partir de: generar la generación de un protocolo del método analítico a validar, poder realizar la elaboración de un plan de validación, la elaboración de registros en bitácora en y medios electrónicos u hojas de cálculo validadas, y la generación de un informe de validación, y poco más al efectuar la aplicación a muestras, dando una aplicación al aprendizaje obtenido.

III. Resultados y discusión

5 Etapa I. Investigación documental

Para llevar a cabo la selección de un procedimiento experimental óptimo para la resolución de un problema específico, el químico analítico debe estar especialmente calificado. Lo anterior ya que, éste será el que registrará el tiempo, el costo y la exactitud de los datos obtenidos, además, de que la selección del método y el diseño experimental deben basarse en la experiencia previa, el conocimiento general de las reacciones químicas involucradas (Seymour, 1984).

De esta manera, durante el proceso de enseñanza-aprendizaje la función de los docentes es guiar y fungir como facilitador a los estudiantes para verificar las etapas involucradas durante el trabajo experimental, así como para identificar los posibles interferentes y concentración de analito que se puede determinar con confianza. Además, durante este proceso, el apoyo docente resulta de gran importancia para la formación de un químico analítico, en virtud de obtener la mayor cantidad de información posible sobre el problema a resolver, como manejar e interpretar los datos químicos que se obtengan (Quintar, 2007).

En este sentido, una vez definida la información analítica requerida para solventar el problema, hay que diseñar la metodología analítica específica para obtener los resultados confiables para el propósito particular, esto implica tener en consideración varios factores: (i) características de la información requerida; (ii) características de la muestra; (iii) medios materiales, instrumentales y humanos disponibles; y, (iv) costo del proceso (Mora , Gras, Maestre, & Todolí-Torró, 2005).

Así una vez recopilada toda la información necesaria, al realizar una selección rigurosa del método analítico a emplear, la consulta de bibliografía científica es esencial, puesto que con frecuencia el problema puede resolverse aplicando algún método previamente establecido. (Mora , Gras, Maestre, & Todolí-Torró, 2005). De tal forma que, se tomó la elección del método colorimétrico del ácido cromotrópico pues la información referida al analito a determinar ayuda a la estrategia analítica a seguir como el objeto, el plan de muestreo, así como las ventajas y desventajas del tipo de análisis a realizar como se discute en el apartado 2.2., de tal forma que,

resulta muy importante en esta etapa establecer un compromiso entre parámetros analíticos como precisión, sensibilidad, selectividad, etc., y otros parámetros que pueden ser optimizados por un análisis FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades, amenazas) para elegir el método a validar, como se muestra en la Tabla 5 (Mora , Gras, Maestre, & Todolí-Torró, 2005).



FORTALEZAS	DEBILIDADES	OPORTUNIDADES	AMENAZAS
<p>Los materiales y reactivos que se emplean son de fácil acceso en un laboratorio de enseñanza.</p> <p>El costo de la validación es muy bajo.</p> <p>Se generan pocos residuos que son de fácil tratamiento, y que atienden a las directrices de la Química verde.</p> <p>Manejo y técnica que se emplea en el equipo UV-VIS.</p>	<p>Se pueden desarrollar habilidades instrumentales con otros equipos.</p>	<p>La experimentación puede realizarse en un aproximado de 8 semanas con clases de 3 horas por semana.</p>	<p>Los métodos de cromatografía son los más utilizados en la industria por su gran resolución</p>

Tabla 5. Análisis FODA el método colorimétrico del ácido cromotrópico para la determinación de metanol

Adecuada de: (Wang, 2004; Vaskova, 2014).

Pese a que los métodos cromatográficos son mayormente utilizados en la industria por su gran resolución, para los objetivos planteados en este proyecto el método del ácido cromotrópico seleccionado es óptimo, ya que en los laboratorios de química

analítica experimental III no se cuentan con los equipos necesarios para poder implementarlos en este curso.

Los residuos que se general son pocos, ya que se utilizan 150 mL por sesión, para la gestión de residuos; estos no deben verterse directamente al desagüe ya que el producto es toxico para los organismos acuáticos, deben tener una neutralización antes de poder desecharlos, esto confiere a los protocolos un atributo de sustentabilidad atendiendo a las directrices de la Química verde.

Contar con un listado de muestras que se pueden emplear para la parte aplicada. De esta manera los estudiantes, asumen un rol protagónico en la búsqueda de la información necesaria para resolver el problema dado. Además, es una experiencia que permite que se recuperen y reafirmen conocimientos de un modo integral lo que ayuda al estudiante a aprender cómo definir un problema y desarrollar un enfoque sistemático para obtener los datos necesarios y generar una base sólida de fundamentos en los que basar las decisiones y una confianza en la capacidad de uno para recopilar datos precisos y reproducibles (Quintar, 2007; Seymour, 1984).

6 Etapa II. Validación de las metodologías seleccionadas de validación

Un punto esencial para la poder llevar a cabo la validación de un método analítico es contar con un protocolo de trabajo establecido con claridad y que cumpla con los apartados que se establecen en la tabla 6.

6.1 Escritura de los protocolos (PNT) a validar de la metodología cualitativa y cuantitativa

Un protocolo de investigación es un documento formal en el cual se plasman un conjunto de elementos que nos permiten conocer datos, como el presupuesto de tiempo y recursos para la ejecución de la investigación y los alcances que tendrá. El protocolo delimita las secciones que debe tener una investigación para que se considere que ha sido correctamente realizada. Estos protocolos son investigaciones

previas al informe final de una investigación y tienen como característica la definición de variables y procedimientos verificables de manera científica. Un protocolo de investigación incluye una descripción del propósito y la metodología o diseño de la investigación. El protocolo debe describir el quién, qué, cuándo, dónde, cómo y por qué de la investigación.

Además, los protocolos se encuentran estructurados con los contenidos más comunes de métodos normalizados como Norma Oficiales Mexicanas, Métodos EPA, etc. Se describen en la Tabla 6.

El protocolo debe estar actualizado, exento de ambigüedades y emplear un lenguaje claro. Una vez confeccionado y aprobado el protocolo quedará terminantemente prohibida la violación y/o alteración del mismo sin previa estudio y/o consulta con las instancias correspondientes (Rosales, Poutou, & Arias, 1998) . Estos protocolos se pueden ver con mayor detalle en el Anexo I y II en donde se especifica cada uno de los apartados antes mencionados.

6.2 Plan de validación

El objetivo de una validación es garantizar que los métodos utilizados cumplan determinados criterios en términos de precisión, exactitud, etc. El plan experimental diseñado para que al ser ejecutado se convierta en evidencia de que el sistema cumple con los requisitos de una validación. Dicho plan debe incluir una definición del sistema a validar e identificar cada parámetro a estudiar, la forma de medirlos, la forma de monitorearlos, así como los criterios de aceptación. El protocolo de validación es específico para cada método a y/o elemento a determinar o identificar, debiendo estar fechado y firmado por las personas responsables de la validación y de su aprobación (Rampazzo, 1989) (Rosales, Poutou, & Arias, 1998)

La validación analítica comprende una herramienta formal, sistemática y documentada que mide la capacidad de un método analítico para proporcionar resultados fiables, precisos y reproducibles.

Tabla 6. Descripción de los componentes del protocolo

Apartado del protocolo	Descripción
Alcance	Se trata de especificar el conjunto de propiedades, características y rasgos del fenómeno analizado, según se considere su importancia
Principio	Describe las etapas esenciales del método, el principio en el que se basan las técnicas analíticas empleadas
Referencias normativas	Este apartado proporcionara una lista de aquellos documentos que son necesarios para la aplicación del método
Definiciones	Proporciona cualquier definición de los términos usados en el texto, que pueda ser necesaria para la comprensión completa del mismo
Interferencias	Es el error sistemático de medición causado por un componente de muestra que no produce una señal en el sistema de medición
Medidas de seguridad	Debe prestarse atención a cualquier riesgo y describir las precauciones detalladas para evitarlo. Si bien se deben detallar las precauciones en las secciones relevantes, la existencia de riesgos y su prevención deben mencionarse aquí
Materiales y equipos	Se describen los materiales y equipos empleados, con suficiente detalle
Reactivos, estándares y materiales de referencia	Se detallan todos los reactivos y materiales requeridos para el proceso analítico
Recolección, preservación y almacenamiento de Muestras	Se debe proporcionar toda la información necesaria para la preparación de la muestra de ensayo a partir de la muestra de laboratorio, se deben incluir los detalles sobre el almacenamiento, acondicionamiento/pretratamiento y eliminación de residuos
Control de calidad	Se explica que tipo de control de calidad se aplica, la frecuencia de las comprobaciones del control de calidad durante el análisis de lotes, los criterios de aceptación y rechazo, las acciones a tomar en el proceso en el caso de fallo
Calibración	Conjunto de operaciones que determinan la relación entre los valores indicados por un instrumento de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia
Procedimiento	Se describe toda la secuencia de operaciones realizadas
Cálculos	Se describen los cálculos realizados para obtener los resultados. Se incluye información sobre las unidades en las que se deben expresar los resultados y otras cantidades; la ecuación utilizada para el cálculo
Informe	En este apartado se especifica la información final donde se Evalúen los apartados del protocolo junto con una conclusión, esto de acuerdo con la normatividad o necesidades, previamente fijadas, que se desean satisfacer
Anexo 1. Identificación de cambios	Son los instrumentos de recolección de la información e instructivos, así como información complementaria del trabajo

Fuente consultada: (Morillas, 2016)

Para validar un método analítico es necesario considerar los requisitos para cada método, ya que no existe un proceso general de validación que cumpla con los requisitos particulares y fines previstos de cada método a validar; los cuales deben de ser planteados antes de dar comienzo al proceso de validación (Boqué, Maroto, Riu, & Xavier Rius, 2002).

El proceso de validación es variable en función de diferentes criterios, como si se trata de un método normalizado o no y el tipo de método según sea un método cualitativo o cuantitativo (Camaró-Sala & et al, 2015). De esta manera los métodos cualitativos son aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un analito determinado en una muestra y los métodos cuantitativos es en el que se desea indicar la cuantificación del analito en una muestra. Los planes de validación pueden ser consultados en los Anexos I y II

6.3 Resultados del trabajo experimental de validación

6.3.1 Desarrollo, adecuación y optimización de la determinación cualitativa de metanol

Bajo la perspectiva de que los resultados que se obtengan de un método cualitativo sentarán la base para la toma de decisiones como efectuar pruebas confirmatorias, su validación debe efectuarse con la misma firmeza que la de un método cuantitativo.

En un análisis cualitativo la concentración de corte (C_c) es la concentración del analito en la cual tras determinaciones sucesivas de la misma muestra dan como resultado un test positivo en el 50 % de las veces y negativo en el otro 50 % y es el parámetro equivalente a la determinación del límite de detección en un método cualitativo. Para la definición de la C_c se trazaron la curva $\% \text{ Taza de respuesta positiva} = \log[f(C \text{ de Metanol})]$, como se muestra en la Figura 8. La concentración de corte para el método cualitativo fue de $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($20 \text{ mg MetOH} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), justo donde la tasa de respuestas positivas es del 100%.

En la Tabla 7 se muestra con detalle las tasas de falsos positivos y de falsos negativos, en referencia a la concentración de corte. Por encima de la concentración de corte el 100% de las respuestas es positivo. Así se puede decir que la prueba cualitativa es efectiva para muestras que contengan metanol en una concentración igual o mayor $20 \text{ mg MetOH} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.

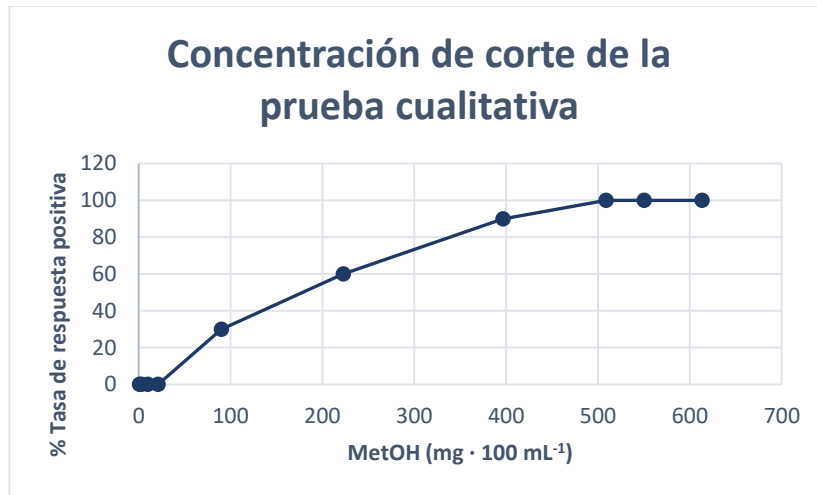


Figura 11. Concentración de corte de la prueba cualitativa de identificación de metanol

Tabla 7. Tasas de falsos positivos y de falsos negativos

	Muestras por encima de la C _c	Muestras por debajo de la C _c	
Prueba positiva	100%	30%	Total de pruebas positiva
Prueba negativa	0%	60%	
	Total de muestras por encima de la C_c	Total de muestras por debajo de la C_c	

Tabla 8. Valores de los parámetros de validación

Parámetro	Pruebas	Porcentaje
TFP	3/10	30%
SD	10/10	100.0%
TFN	0/10	0.0%
ED	6/10	60%

A partir de los resultados obtenidos de la validación, se aprecia que el método cualitativo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas es preciso y permite efectuar la determinación cualitativa efectiva para muestras que contengan metanol en una concentración igual o mayor $500 \text{ mg MetOH} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, sin embargo a partir de bebidas que contengan un $90 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de metanol, la prueba empieza dar alrededor del 30% de tasa positiva y para concentraciones de $223 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ el porcentaje de tasa de respuesta positiva ya es del 60% de tasa positivas, evidencia suficiente para definir la necesidad de una prueba confirmatoria a partir de la coloración obtenida. Lo anterior, da prueba de que lo hace completamente adecuado para los fines de la NOM-142-SSA1/SCFI-2014, donde se requiere identificar bebidas alcohólicas que presenten metanol.

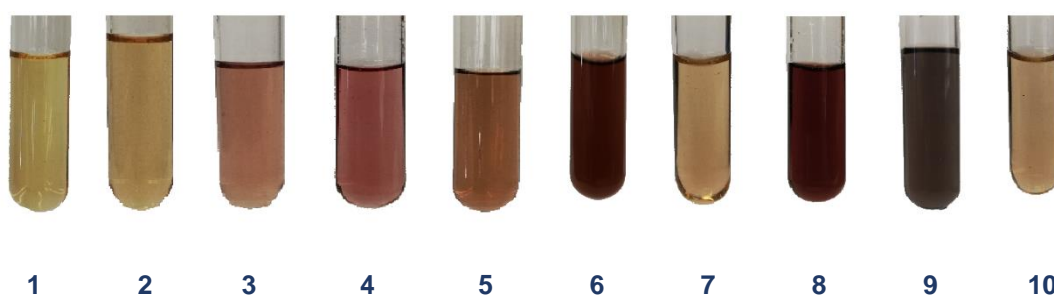


Figura 12. Aplicación a muestras método cualitativo

Elaboración propia

En este sentido, dado que para el método cualitativo se debe definir la respuesta o cualidad buscada para asociarla con un resultado “positivo” de la prueba, la ausencia de esta cualidad se asocia con un resultado “negativo”; de tal forma que la relación entre estas respuestas permitirá calcular los parámetros de validación dependiendo del propósito analítico, como selectividad, efectos de matriz, linealidad, precisión, exactitud, rango, detección y cuantificación, y robustez. Por lo tanto, se deben evaluar más parámetros de rendimiento analítico para que la validación analítica sea apropiada para el propósito previsto para cada método a validar, en este caso la

respuesta positiva es la aparición del color violeta (Marson, Concentino, & Junkert, 2020).

Desarrollo, adecuación y optimización de la determinación cuantitativa de metanol

Se trabajó en un intervalo de trabajo lineal de 8 niveles de concentración en el intervalo de 150-600 mg · 100 mL⁻¹ en donde se trazó el gráfico correspondiente de la concentración versus la absorbancia leída en por el espectrofotómetro, donde se obtuvieron linealidad y sensibilidad.

La Figura 13 muestra el comportamiento lineal de la respuesta analítica en función de la concentración.

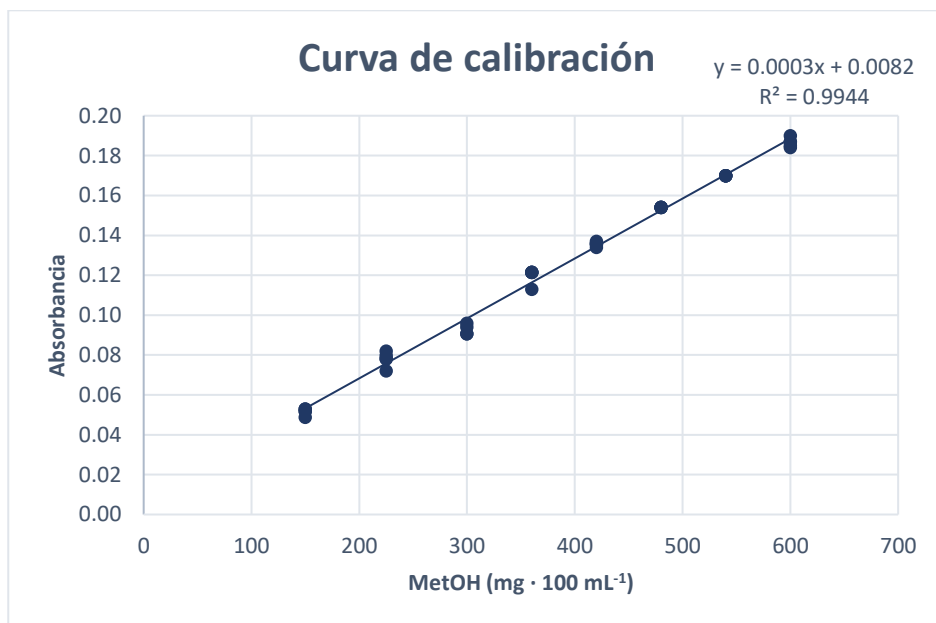


Figura 13. Curva de calibración general Absorbancia vs Concentración

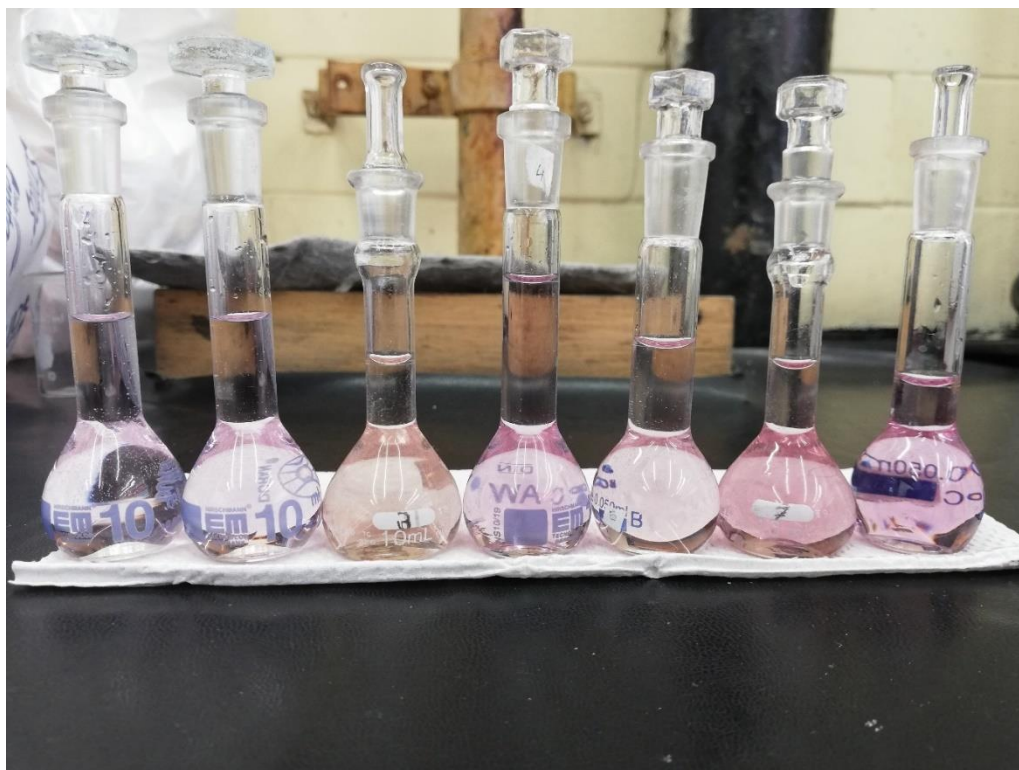


Figura 14. Elaboración de la curva de calibración para enseñanza en el grupo de Analítica Experimental III

A partir de la información obtenida en la curva de calibración se puede dar paso a la obtención de los demás parámetros como lo son los límites de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC), el LDD es la concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada y el LDC es la concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables.

Como se establece en el plan de validación el LDC es menor a la concentración más baja del intervalo lineal de trabajo, y el LDD es menor al límite de cuantificación. Estos dos parámetros se obtuvieron a la concentración más baja de la curva de calibración ($150 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), así como la desviación estándar de las lecturas de la absorbancia a esa concentración, estos resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC)

Experimento	Concentración	Abs	
1	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.058	
2	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.059	
3	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	
4	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	
5	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.062	
	Media	0.0602	
	Desviación	0.0016	
	LDC	32.9	10.4
	LDD	16.4	5.2

El cálculo de recobro se determinó con la medición de disoluciones a la concentración de 300 mg · 100 mL⁻¹, donde se obtiene la desviación estándar relativa y el porcentaje de recobro que indica la cantidad del analito que se recupera para evaluar la eficiencia del método.

La repetibilidad y la reproducibilidad se realizaron con la medición de la absorbancia de siete disoluciones a la mínima concentración, esto con el objetivo de encontrar la variación que se tiene cuando se realizan a las mismas condiciones de trabajo como se muestran en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Repetibilidad

Experimento	Concentración	Abs	Conc. Real
1	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.06	0.0154
2	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.06	0.0154
3	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	0.0157
4	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	0.0157
5	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	0.0157
6	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.062	0.0159
7	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.066	0.0170
	Media		0.0158
	Desviación		0.0006
	DER		3.5

Tabla 11. Reproducibilidad

Experimento	Concentración	Abs	Conc. Real
1	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.06	0.0154
2	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	0.0157
3	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.061	0.0157
4	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.062	0.0159
5	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.062	0.0159
6	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.064	0.0165
7	150 mg · 100 mL ⁻¹	0.065	0.0167
		Media	0.0160
		Desviación	0.0005
		DER	2.97

A partir de los parámetros de validación obtenidos y mostrados en la Tabla 12 se puede observar que el método cuantitativo para determinación de metanol en bebidas alcohólicas se cuenta con los resultados pertinentes para cumplir con el objetivo de mostrar cómo se realiza una validación para para los fines de la NOM-142-SSA1/SCFI-2014, donde se requiere cuantificar metanol en concentraciones mayores a 300 mg · 100 mL⁻¹, presente en bebidas alcohólicas.

Tabla 12. Parámetros de desempeño de la determinación cuantitativa de metanol

Parámetro	Valor obtenido
Intervalo de concentraciones	150-600 mg · 100 mL ⁻¹
Sensibilidad analítica	0.003
r²	0.9944
LDD (mg · 100 mL⁻¹)	10.4
LDC (mg · 100 mL⁻¹)	5.2
DER	2.7
% Recobro (300 mg · 100 mL⁻¹)	98.4
Rep. DER (%)	3.50
Reprod. DER (%) (300 mg · 100 mL⁻¹)	2.97

6.4 Informe de validación

Para dar constancia de los registros del proceso de validación, generalmente en los propios registros de análisis del laboratorio, así como también de las conclusiones de la validación, contrastando si se cumplen los criterios de aceptación/rechazos definidos a priori; estas conclusiones pueden registrarse en el informe de validación (Organismo Argentino de Acreditación, 2003).

Los procesos validación de métodos deben ser documentados para facilitar su evaluación durante el proceso de acreditación. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto. Para los laboratorios el informe de validación debe incluir la firma del personal responsable que realizó el ensayo, el muestreo cuando, así como nombre y cargo (EMA, 2021), en este caso, se debe demostrar mediante la rastreabilidad de los resultados que los muestreos, ensayos y calibraciones fueron avalados por un signatario autorizado del laboratorio.

El laboratorio debe de conservar los informes de resultados en buenas condiciones. Los informes para trámites ante la autoridad deberán ser impresos y los que estén en medio electrónicos deberán ser almacenados por los menos 4 años (CCAYAC, 2021), en dichos informes deberán incluirse los siguientes puntos, cuando corresponda:

- Objetivo y alcance del método
- Objetos a ensayar
- Veracidad Trazabilidad de equipos
- Detalle de insumos, reactivos, materiales de referencia y acondicionamiento de las muestras
- Lista de equipos, instrumentos y dispositivos
- Parámetros de validación evaluados
- Registro de las condiciones de los ensayos y gráficos representativos (curvas de calibración, gráficos de residuos, cromatogramas, etc.)
- Resultados obtenidos. Incertidumbre de medición

- Personas que participaron en la validación del método
- Conclusiones, criterios de aceptación o rechazo, criterios de revalidación

El informe final debe presentar los datos analíticos de tal manera que se pueda comprender fácilmente y obtener las conclusiones pertinentes, este incluirá las referencias de la calibración y verificación de los equipos utilizados, los resultados primarios y estadísticos de cada parámetro, la discusión de los resultados y las conclusiones de la validación (Castillo-Aguilar & González-Hernández, 1996). En los Anexos I y II, se muestran los informes de validación por método.

7 Etapa III. Aplicación de enseñanza

En la aplicación de la enseñanza, Se aproximará a los alumnos al inicio de cada semestre, a los diferentes métodos analíticos y sus respectivas validaciones.

Para el desarrollo del proyecto, se deberá considerar un semestre completo, en el cual los alumnos deben generar la documentación del proceso de la validación.

Dentro de las actividades en clase se incluyen sesiones donde se revisarán con los estudiantes los aspectos teóricos fundamentales, la validación de métodos analíticos cualitativos y cuantitativos, así como la elaboración de un taller de manejo de datos experimentales generados en una validación.

7.1 Herramientas docentes

Dentro de las herramientas docentes, se plantea un portafolio de aprendizaje, el cual funge como una herramienta pedagógica en donde los alumnos deben desarrollar las habilidades para resolver un problema analítico plausible, de esta forma no se les proporcionan los protocolos como tal, sino que solo se darán a conocer los documentos normativos, o bien, la literatura pertinente aplicable a su proyecto, para orientarlos a comprender de mejor manera el tema de investigación.

De esta manera, un portafolio de aprendizaje no es únicamente un nuevo instrumento de evaluación del desempeño, también puede considerarse en sí mismo, un nuevo género de “texto” académico o un tipo distinto de producción o trabajo escolar que

reúne (o debe reunir) los requisitos de un enfoque situado del proceso enseñanza-aprendizaje-evaluación (Díaz-Barriga F. , 2006) y, a su vez es una invitación a la diversidad, a recuperar la historia individual del conocimiento construido por el autor del mismo y, por ende, debiese privilegiar una mirada cualitativa y una perspectiva única respecto a un estudiante, su trayecto, identidad y producciones.

El portafolio, físico o electrónico, sólo tiene sentido si permite fomentar la creatividad, el juicio y el pensamiento reflexivo en el estudiante, pero al mismo tiempo, requiere del establecimiento de estándares o criterios de valoración apropiados. Los estándares de hecho guían la conformación del portafolio mismo y ofrecen al estudiante criterios claros y precisos del nivel de desempeño esperado, evitando la ambigüedad y los sesgos en la evaluación (Díaz-Barriga, Romero-Martínez, & Heredia-Sánchez, 2012).

En trabajo presentado, como primer paso, se delimito y definió el objeto de la investigación o problema. En este caso se enfocó desde un punto de vista docente en la validación de la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol en bebidas, así como determinar claramente los objetivos del experimento.

Se tomó en cuenta la bibliografía existente, así como los reactivos, el material y el equipo disponible, además de que se evaluó el tiempo en que es posible realizar cada uno de los métodos, estos no fueron mayores a las tres horas, puesto que es el tiempo en que se tiene disponible para realizarlos en una clase de un curso.

Una vez realizada la búsqueda bibliográfica, se elaboró un diseño experimental, donde sea conocida la naturaleza del problema, gracias a la literatura consultada se evaluaron dos métodos para la determinación de metanol y se adecuaron los volúmenes y cantidades de reactivos que se utilizaron.

Al finalizar, se procedió al tratamiento de los datos obtenidos llenando las tablas con la información obtenida de las lecturas de las mediciones realizadas con la finalidad de detectar cualquier anomalía que se presente durante el desarrollo del experimento, así como trazar las gráficas pertinentes y calcular los valores para su análisis.

Las secuencias utilizadas en ambos métodos, cumplieron con el objetivo de determinar la presencia de metanol en las bebidas alcohólicas y se detallan junto con sus resultados en los anexos I y II. Además, los cuidados o puntos clave de cada método son mostrados en las notas de apoyo para el docente (Ver sección VI del Anexo I y Anexo II). El método fue aplicado a diez muestras, seleccionadas de forma en que unas tengan los sellos de las entidades que permiten la venta de estos mismos, y otras que son elaboradas sin sellos de garantía, estas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Características de las muestras

No.	Muestra	Descripción de la muestra
1	Ginebra London N°1	Bebida alcohólica destilada que contiene extractos de 12 plantas de color turquesa tenue a la vista
2	Sidra de Manzana	Destilado de sidra de manzana incoloro a la vista
3	Tequila José Cuervo Tradicional	Bebida alcohólica destilada proveniente del agave weber azul con coloración amarillo pálido
4	Mezcal Oro de Oaxaca	Bebida alcohólica destilada proveniente del agave con coloración amarillo pálido
5	Tequila Jarana Reposado	Bebida alcohólica destilada proveniente del agave weber azul con coloración amarillo pálido
6	Agua Ardiente Artesanal	Bebida alcohólica destilada proveniente de la agave traslucida a la vista
7	Ron Bacardí Superior Blanco	Bebida alcohólica destilada de caña de azúcar traslucida a la vista
8	Mezcal de Oaxaca Artesanal	Bebida alcohólica destilada proveniente del agave con coloración amarillo pálido
9	Licor de caña Tonayán	Bebida alcohólica con agua desmineralizada aguardiente de caña y agave con colorante caramelo oscuro a la vista
10	Whisky Johnnie Walker Red Label	Bebida alcohólica obtenida por la destilación de la malta fermentada de cereales de color oro claro a la vista

En la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos en los análisis cualitativo y cuantitativo, y en la Figura 15 se muestra una imagen de las coloraciones obtenidas.

Tabla 14. Resultados de la aplicación a muestras

No.	Muestra	Análisis cualitativo		Análisis cuantitativo
		Positivos	Negativos	Concentración mg · 100 mL ⁻¹
1	Ginebra London N°1	0	10	<LDD
2	Sidra de Manzana	7	3	93.5
3	Tequila José Cuervo Tradicional	6	4	222.8
4	Mezcal Oro de Oaxaca	10	0	508.8
5	Tequila Jarana Reposado	9	1	396.4
6	Agua Ardiente Artesanal	10	0	613.1
7	Ron Bacardí Superior Blanco	0	10	20.9
8	Mezcal de Oaxaca Artesanal	10	0	2839.6
9	Licor de caña Tonayán	10	0	3225.4
10	Whisky Johnnie Walker Red Label	6	4	98.7



Figura 15. Aplicación a muestras método cuantitativo (ordenadas conforme a la tabla 14)

Elaboración propia

Se puede observar que en ocho muestras de las que se analizaron se tiene la presencia de metanol gracias a la observación de la coloración violeta como se aprecia en las muestras 2,3,4,5,6,8 y 9, esto quiere decir que la prueba fue positiva como se plantea en el procedimiento, así que se procedió a cuantificar el metanol con el método cuantitativo.

Como se puede observar la concentración de metanol que se encuentra presente en las bebidas alcohólicas que son elaboradas con un método artesanal no controlado como lo son las bebidas artesanales Mezcal Oro de Oaxaca, Agua Ardiente, Mezcal de Oaxaca sin marca, estas bebidas son las que tienen una mayor concentración de metanol en comparación de las que son elaboradas conforme a la norma oficial mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014 la cual establece que el límite permisible de metanol presente es de $300 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ y las que se elaboran industrialmente; como lo son Tequila Jarana Reposado y Licor de caña Tonayán, las cuales superan límite permisible para el contenido de metanol en destilados de tequila y sus derivado, y se sabe que el metanol es un constituyente inevitable y que se encuentra presente en todas las bebidas alcohólicas en mayor o menor proporción incluso en trazas, este se determinó de acuerdo con los parámetros de desempeño evaluados en ambos métodos analíticos aplicados, en el caso del método cualitativo los parámetros fueron la sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica, precisión (tasa de falsos positivos, tasa de falsos negativos), concentración de corte; Por otra parte, para el método cuantitativo los parámetros evaluados fueron el intervalo lineal, sensibilidad analítica, límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC), exactitud como recobro, repetibilidad y reproducibilidad, estos parámetros se presentan a detalle en los Anexos I y II; así como los intervalos que se establecieron para cada uno de ellos.

7.2 Prueba piloto en grupo

Fueron probados los protocolos propuestos frente a un grupo de alumnos en la materia de ANALÍTICA EXPERIMENTAL III durante los semestres 2019-2 y 2020-1. Durante este periodo, se presentó un método, ya sea cualitativo o cuantitativo, a distintos grupos, con el objeto de que los estudiantes adquirieran los conocimientos para validar un método a partir de la generación de un protocolo, para lo que se utilizó un plan de validación, el manejo de una bitácora (ya sea física o en medios electrónicos como lo son las hojas de cálculo validadas), y la generación de un informe de validación.

Al finalizar cada uno de los semestres los alumnos fueron capaces de implementar estos conocimientos, al elaborar y presentar un informe final donde se muestran los resultados obtenidos de acuerdo con los protocolos propuestos. Además, se muestra/comprueba que las metodologías cualitativa y cuantitativa para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas son viables para cumplir con los objetivos planteados.

De forma adicional, los alumnos presentaron los diferentes problemas al momento de aplicar dichas metodologías, en donde resaltan algunas dificultades en los cálculos para la preparación de las disoluciones utilizadas y el orden de los pasos a seguir en dichas metodologías.

Dentro de las observaciones generales para cada una de las metodologías aplicadas, se anexan notas de apoyo docente para optimizar cada una de las metodologías. Anexos I y II.

IV. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo general de este trabajo, se logró establecer desde un enfoque docente la validación de los protocolos para la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol en bebidas alcohólicas.

De la misma manera, derivado de la revisión bibliográfica que se plantea dentro del protocolo, se logró identificar la metodología óptima para la determinación cuantitativa y cualitativa de metanol en bebidas alcohólicas y establecer los protocolos normalizados de trabajo, los cuales recopilan y evalúan las evidencias de desempeño que se validaron en el curso.

Así mismo en cada uno de los protocolos, se detalló cada una de las metodologías que se seleccionaron con la finalidad de demostrar que cumplen con el propósito docente, apoyándose de los planes de validación para cada uno de los métodos y evaluando los parámetros de desempeño, así como sus criterios de aceptación con el objetivo de demostrar que el método es adecuado.

Además, la propuesta de enseñanza que se plantea, se presentó con éxito durante los semestres 2019-2 y 2020-1, donde se observó que los protocolos pueden ser reproducidos con la infraestructura que se cuenta en una laboratorio de enseñanza docente donde los materiales, reactivos y equipos son de fácil acceso, además, el costo de realizar la validación de estos métodos es muy bajo, y el proceso de validar estas metodologías es de tres horas por sesión lo cual resulta óptimo para realizarlo en su totalidad durante un curso impartido en un semestre de 16 semanas. De esta forma que, los estudiantes al término de curso cuentan con un aprendizaje significativo sobre la validación de métodos analíticos.

Bibliografía

- AGROVIN. (2021). *Catálogo de Vendimia 2021 Propuestas de elaboración*. Obtenido de https://www.agrovin.com/agrv/pdf/catalogos/Comienza_la_aventura_es.pdf
- Aleixandre-Benavent, R., González Muñoz, M., Alonso-Arroyo, A., & González de Dios, J. (2011). Fuentes de información bibliográfica (I). Fundamentos para la realización de búsquedas bibliográficas. *Acta Pediátrica Española* 69 (3), 131-136.
- Barwick, V. E. (2017). Method validation in analytical sciences: discussions on current practice and future challenges. *Accreditation and Quality Assurance*, 22(5), 253-263.
- Boqué, R., Maroto, A., Riu, J., & Xavier Rius, F. (2002). Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites*, 53(1), 128-143.
- Borroto-Mato, D. L.-I.-G.-L. (2017). Aspectos generales sobre la determinación de alcoholes superiores en bebidas alcohólicas. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(3), 58-65.
- Camaró-Sala, M. L., Catalá-Cuenca, V., Gimeno-Cardona, C., Olmos-Martínez, P., & Martínez-García, R. (2013). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), 2.
- Castillo-Aguilar, B., & González-Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), Recuperado en 08 de julio de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&tlng=es. Obtenido de *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1).
- CCAYAC. (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. *Guía_CCAYAC_validacion.pdf*, 1-20.
- CCAYAC. (16 de Febrero de 2021). *Guía de evaluación para laboratorios de prueba*. Obtenido de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/622519/CCAYAC-G-01.pdf>
- CENAM, & EMA. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. *México*, 13.


- Chauvel, J., Henslee, W., & Melton, L. (2002). Teaching Process Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*, 381A-384A.
- Christian, G. D. (2002). International Meeting Examines Analytical Curricula. *Analytical Chemistry*, 219A-221A.
- Consejo regulador del tequila. (2019). *Consejo regulador del tequila*. Obtenido de Laboratorio Bebidas Alcoholicas: <https://www.crt.org.mx/index.php/es/laboratorio-bebidas-alcoholicas>
- Delgado-Vellosillo, I. (2020). *Obtención de bioetanol mediante procesos de fermentación con levaduras: revisión bibliográfica*. Obtenido de <https://zagan.unizar.es/record/97964/files/TAZ-TFG-2020-3237.pdf>
- Díaz-Barriga, F. (2006). Enseñanza situada: vínculo entre la escuela y la vida. México: McCrawHil.
- Díaz-Barriga, A. F., Romero-Martínez, E., & Heredia-Sánchez, A. (2012). Diseño tecnopedagógico de portafolios electrónicos de aprendizaje: una experiencia con estudiantes universitarios. *revista electrónica de investigación educativa*, 14(2), 103-117.
- Dirección General de Normas. (1986). COLPOS. Recuperado el 05 de 2019, de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-021-1986.PDF>
- EcuRed. (2020). *Formación de compuestos responsables del aroma y sabor de las bebidas*. Recuperado el 20 de 06 de 2020, de Formación de compuestos responsables del aroma y sabor de las bebidas. (s. f.). EcuRed. Recuperado 1 de julio de 2020, de https://www.ecured.cu/Formaci%C3%B3n_de_compuestos_responsables_del_aroma_y_sabor_de_las_bebidas
- EMA. (21 de 03 de 2021). <http://consultaema.mx/>. Obtenido de MANUAL DE PROCEDIMIENTOS CRITERIOS DE APLICACIÓN DE LA NORMA ISO/IEC 17025 (vigente): http://consultaema.mx:75/pqtinformativo/GENERAL/Carpeta_2_Criterios_evaluacion/MP-FE005_Criterios_de_aplicacion_NMX-EC-17025-IMNC-2006_2.pdf
- Facultad de Química. (2019). *Facultad de Química, UNAM*. Recuperado el 04 de 05 de 2019, de <https://quimica.unam.mx>

- Fagnani, E. M. (2003). Chromotropic acid–formaldehyde reaction in strongly acidic media. The role of dissolved oxygen and replacement of concentrated sulphuric acid. *Talanta*, 60(1), 171-176.
- Fernández, M. Q. (Agosto de 2016). *¿Qué diferencia hay entre fermentado y destilado?* Obtenido de Forbes México: <https://www.forbes.com.mx/diferencia-fermentado-destilado/>
- Herbstreith , & Fox. (2001). *Herbstreith & Fox. (2001). The Specialists for*. Obtenido de Herbstreith & Fox. (2001). The Specialists for
- Hermoso Domínguez, J. (30 de 05 de 2021). *Anexo D Destilacion*. Obtenido de Dto. de ingeniería química y ambiental: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/20274/fichero/ANEXOS%252FANEXO+D.pdf>
- Jendral, J. A., Monakhova, Y. B., & Lachenmeier, D. W. (2011). Formaldehyde in alcoholic beverages: large chemical survey using purpald screening followed by chromotropic acid spectrophotometry with multivariate curve resolution. *nternational journal of analytical chemistry*, 2011.
- Lazos-Martínez, R. J., & Hernández-Gutiérrez, I. (2004). LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS: UN ENFOQUE PRÁCTICO. *Simposio de Metrología*, 1-5.
- López, U., M:D:C, López Vidal , R., & Ramos Mayo, C. (2014). VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN LABORATORIOS DE ENSAYO DE AGUAS RESIDUALES. *Kuxulkab' 19(36)*, 17.
- López-Naranjo, F., Godínez-García, I. H., Flores-Hernández, R., Altagracia-Martínez, M., & Córdova-Moreno, R. (2013). La calidad de varias bebidas alcohólicas comercializadas en México y las consecuencias potenciales en la salud pública. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 44(4)*, 62-72.
- López-Santiago, N. R., Gavilán-García, I. C., & Flores-Avila, C. (2019). Propuesta de enseñanza: valudación de métodos analíticos cualitativos. *Tendencias en docencia e investigación química (5)*.
- López-Santiago, N., & Orta-Pérez, M. (2012). *Memorias del Quinto Foro Nacional de Ciencias Básicas*. Obtenido de <http://dcb.fi-c.unam.mx/Eventos/Foro5/memorias/lista.php?id=3>

- Marquina, H. M.-A. (2018). Concentración de metanol en algunas bebidas alcohólicas comercializadas en Venezuela por medio de la técnica GC-FID. *Avances en Química*, 13(2), 41-44.
- Marson, B. M., Concentino, V., & Junkert, A. M. (2020). VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW. *Química Nova*, 43, 1190-1203.
- Microlab Industrial. (16 de Enero de 2019). Obtenido de <http://www.microlabindustrial.com/blog/como-conocer-la-calidad-de-bebidas-alcoh%C3%B3licas-o-saber-si-se-encuentran-adulteradas>
- Mora , J., Gras, L., Maestre, S. E., & Todolí-Torró, J. L. (2005). Introducción a la experimentación en química analítica: índice e introducción.
- Morillas, P. P. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos-Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados: Eurolab España*. España: EUROLAB ESPAÑA. PP, .
- Organismo Argentino de Acreditación. (2003). Guía para validación de métodos de ensayo. Código: GUI-LE-03. Versión, (1).
- Pérez-Vega, A. I., Fernández-Fernández, A. K., & Ramírez-Peña, C. (2015). *Todo sobre bebidas alcohólicas adulteradas*. Obtenido de <http://revistacofepris.salud.gob.mx/inter/2015/inspector.html>
- Peters, F. T. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165 (2-3), 216-224.
- Procedures, A. (11 de Julio de 2015). *Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry*. Obtenido de www.fda.gov: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>
- Quintar, S. E. (2007). Criterio de selección de un método analítico. *Alambique: Didáctica de las ciencias experimentales* (54), 100-107.
- Quiroga-Fernández, M. (16 de Agosto de 2016). *Forbes México*. Obtenido de ¿Qué diferencia hay entre fermentado y destilado?: <https://www.forbes.com.mx/diferencia-fermentado-destilado/>

- Rampazzo, P. (1989). Rampazzo, P. (1990). Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. *Farmaco (Societa chimica italiana Farmaco, 45(6 Suppl))*, 807-815.
- Rehm, J., Kanteres, F., & Lachenmeir, D. (2010). Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. *Drug and alcohol review 29(4)*, 426-436.
- Rius de la Pola, P. (2011). La docencia de la Química: ¿ una cuestión de actitudes? Actitudes del docente de licenciatura en Química. *Educación química 22(2)*, 123-133.
- Rosales, I., Poutou, R., & Arias, J. (1998). Validación de métodos analíticos empleados en el control de calidad de productos biotecnológicos. *Revista Colombiana de Biotecnología, 1(2)*, 73-75.
- Ruisánchez, I., Trullols, E., & Rius, F. X. (2003). Validación de métodos analíticos cualitativos. *Técnicas de laboratorio, 81*, 328-335.
- Ruiz, R. (01 de Agosto de 2019). *Kami de deus*. Obtenido de Fermentación alcohólica: <https://www.kamidedeus.com/blog/2019/08/01/fermentacion-alcoholica>
- Sánchez, J. F. (2010). Validación de métodos analíticos no cuantitativos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41(2)*, 15-24.
- Secretaría de salud. (1995). NOM-142-SSA1-1995, Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado el 17 de Junio de 2020, de NORMA Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995, Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.: <http://www.corprcint.com.mx/MarcoLegalNormas/NOM-142-SSA1-1995.pdf>
- Secretaría de salud. (2014). NORMA Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. *Diario Oficial de la Federación*.
- Seymour, M. D. (1984). Analytical chemistry. *Journal of Chemical Education 61(3)*, 228-230.
- Silva, M. M. (2000). Revisión: Bebidas destiladas obtenidas de la fermentación del orujo de uva. *Food Science and Technology International 6 (4)*, 285–300.

- Taverniers, I. D. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem* 74(5), 835–855.
- Trullols, E., Ruisánchez, I., & Ruis, F. X. (2004). Validation of qualitative analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23(2), 137-145.
- Vaskova, H. (2014). Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*, 8., 27-34.
- Vilanova, J. C. (2012). Revisión bibliográfica del tema de estudio de un proyecto de investigación. *Radiología* 54 (2), 108-114.
- Wang, M. W. (2004). A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* 17(2), 187-196.
- Ward, L. A. (1998). Industria de las bebidas. En Piombino, *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. (págs. 65.1-65.17).
- Waste, A. (2014). Fermentación Alcohólica-Bioetanol. *CTC, CSIC, Agrupal.*, 1-4.
- Woodget, B. (2003). Teaching Undergraduate with the Process Model Analytical Science with the Process Model. *Analytical Chemistry*, 307-310.

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

Anexo I. Portafolio de evidencias. Método cualitativo

VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS: UN ENFOQUE DOCENTE

Cuadro de aprobación	
Elaboración:	Luis Enrique Alcántara Manjarrez
Revisión:	Norma Ruth López Santiago
Aprobación:	Norma Ruth López Santiago
Semestre:	2020-2



I. Protocolo normalizado de trabajo

1. Alcance

Método químico colorimétrico aplicado a bebidas alcohólicas para de la determinación de metanol, por medio de la reacción con el ácido cromotrópico.

2. Principio

El método se basa en la oxidación del metanol a formaldehído por acción del permanganato de potasio en medio ácido. El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico para producir un complejo en condiciones ácidas. La absorbancia del compuesto alcanza su pico a 575 nm. El metanol es un alcohol que se encuentra presente en todas las bebidas en mayor o menor proporción inclusive en trazas. Proviene de la hidrólisis de las pectinas, de las materias primas vegetales que se fermentan, de importancia ya que presenta una alta toxicidad para el ser humano.

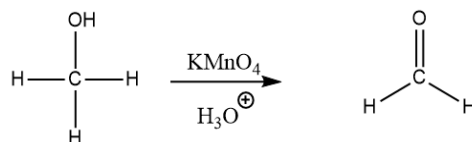


Figura 1. Oxidación de metanol a formaldehído

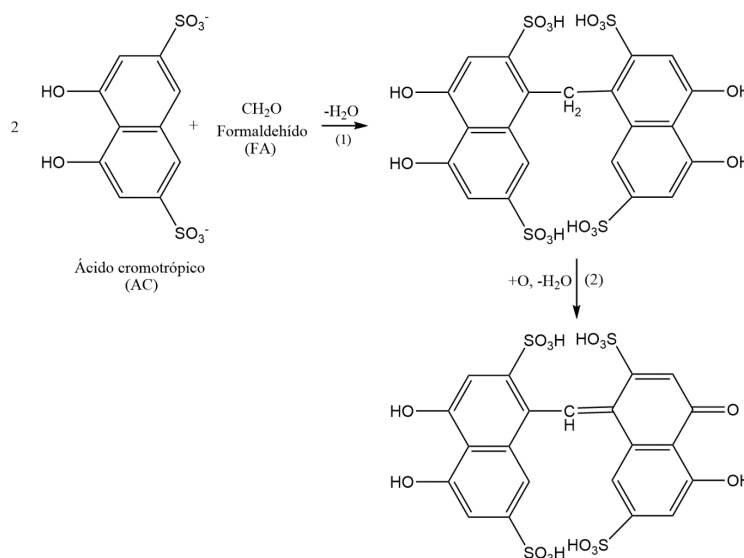



Figura 2. Propuesta de mecanismo entre el formaldehído y el ácido cromotrópico

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

3. Referencias normativas

- NORMA Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- NMX-V-021-1986. Bebidas alcohólicas destiladas. Determinación de metanol. Distillated alcoholic beverages. Determination of methanol. Normas mexicanas. Dirección general de normas.


4. Definiciones

- **Aditivos alimenticios:** sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o su conservación.
- **Alcohol etílico:** producto obtenido por fermentación, principalmente alcohólica de los mostos de las materias primas de origen vegetal que contienen azúcares o de aquellas que contienen almidones sacarificables y que dichos mostos fermentados son sometidos a destilación y rectificación. Su fórmula es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$.
- **Bebida alcohólica:** aquella obtenida por fermentación, principalmente alcohólica de la materia prima vegetal que sirve como base utilizando levaduras del género *Saccharomyces*, sometida o no a la destilación, rectificación, redestilación, infusión, maceración o cocción en presencia de productos naturales, susceptibles de ser añejadas, que pueden presentarse en mezclas de bebidas alcohólicas y pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos por la secretaría, con una graduación alcohólica de 2% a 55% en volumen a 20°C.
- **Bebida alcohólica destilada:** producto obtenido por destilación de líquidos fermentados que se hayan elaborado a partir de materias primas vegetales en las que la totalidad o una parte de sus azúcares fermentables, hayan sufrido como principal fermentación, la alcohólica, siempre y cuando el destilado no haya sido rectificado totalmente, por lo que el producto deberá contener las sustancias secundarias formadas durante la fermentación y que son características de cada bebida, con excepción del vodka, susceptibles de ser abocadas y en su caso

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

añejadas o maduras, pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.

- **Bebida alcohólica fermentada:** producto resultante de la fermentación principalmente alcohólica de materias primas de origen vegetal, pueden adicionarse de ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Bebidas alcohólicas preparadas y cócteles:** productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, fermentadas, licores genuinos o mezclas de ellos, pueden adicionarse de otros ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Bebidas alcohólicas preparadas y cócteles:** productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, fermentadas, licores genuinos o mezclas de ellos, pueden adicionarse de otros ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Buenas prácticas de fabricación:** conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su consumo.
- **Coadyuvante de elaboración:** sustancia o materia que no se consume como ingrediente alimenticio por sí misma, y se emplea intencionalmente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes, para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración, pudiendo dar lugar a la presencia no intencionada, pero inevitable, de residuos o derivados en el producto final.
- **Ingrediente:** cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, que se empleen en la fabricación o preparación de un alimento o bebida no alcohólica y esté presente en el producto final, transformado o no.
- **Licores:** productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, espíritu neutro, alcohol de calidad o común o mezcla de ellos y agua, aromatizados y saborizados con procedimientos específicos y a los cuales pueden agregarse ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Límite máximo:** cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se deben exceder en un alimento, bebida o materia prima.
- **Lote:** Cantidad de un producto elaborado en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad.

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha:2019/01/15</p>
---	---	--

- **Métodos de prueba:** procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

5. Interferencias

No se encuentra reportada la existencia de alguna interferencia para este método, incluso si el acetaldehído se encuentra presente en un gran exceso.

6. Medidas de seguridad

En todo momento se debe de utilizar anteojos y guates de seguridad, bata de algodón. Para la manipulación de reactivos peligrosos se deberán manipular en la campana de extracción.

7. Materiales y equipos

- Matraz volumétrico de 10 mL y 25 mL
- Espátula
- Gradilla
- Agitador de vidrio
- Parrilla de calentamiento y agitación
- Vasos de precipitados de diferente volumen
- Tubos de ensaye
- Pipetas Pasteur

8. Reactivos, estándares y materiales de referencia


- Ácido fosfórico diluido (H_3PO_4) 1:20 mol/L.
- Disolución de permanganato de potasio ($KMnO_4$) 1:20 mol/L.
- Disolución de bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) 1:20 mol/L.
- Disolución de ácido cromotrópico.

9. Recolección, preservación y almacenamiento de Muestras

- Las muestras que se manipulen deben de encontrarse previamente destiladas.
- Las muestras utilizadas deberán ser envasadas y almacenadas en un lugar seco.

10. Control de calidad

- Elaboración de pruebas a la matriz sin la presencia del analito (blanco).
- Preparación del ácido cromotrópico cada dos semanas.

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

- Preparación del permanganato de potasio cada mes.

11. Procedimiento

Preparación de reactivos


- **Ácido fosfórico diluido (H₃PO₄) 1:20 mol/L:** Se miden 0.66 mL de H₃PO₄ concentrado y se llevó lleva a un aforo de 25 mL con agua destilada.
- **Disolución de permanganato de potasio (KMnO₄) 1:20 mol/L:** Se pesan 0.51 g de KMnO₄ y se llevan a un aforo de 10 mL con agua destilada.
- **Disolución de bisulfito de sodio (NaHSO₃) 1:20 mol/L:** Se pesan 1.25 g de NaHSO₃ y se llevan a un aforo de 25 mL con agua destilada.
- **Disolución de ácido cromotrópico:** Se pesan y se disuelven 50 mg de ácido cromotrópico en 100 mL de ácido sulfúrico diluido al 75%.

Experimental

- En un tubo de ensayo se colocan dos gotas de la muestra, posteriormente se agrega una gota de disolución de ácido fosfórico (1:20) mol/L y una o dos de disolución de permanganato de potasio (1:20) mol/L. Posteriormente se mezcla cuidadosamente y se deja reposar la mezcla durante un minuto.
- Se agrega la disolución acuosa de bisulfito de sodio (1:20) mol/L, gota a gota y agitando, hasta que el color violeta del permanganato de potasio desaparezca.
- Si la mezcla presenta una coloración café, se agregan gotas de disolución acuosa de ácido fosfórico (1:20) mol/L hasta la desaparición del color.
- A la disolución incolora resultante, se le agregan 5 mL de la disolución de ácido cromotrópico, y se calienta la mezcla en baño maría aproximadamente a 60°C durante diez minutos. En presencia de metanol se observa una coloración violeta/café.
-

12. Informe


Indicar si la presencia de metanol fue positiva o negativa en la muestra

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

No.	Muestra	Presencia de metanol
1	Indicar el nombre de la muestra	Indicar negativo o positivo

Anexo 1. Identificación de cambios

Punto	Página	Cambio(s)
NA	NA	NA

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

II. Plan de validación

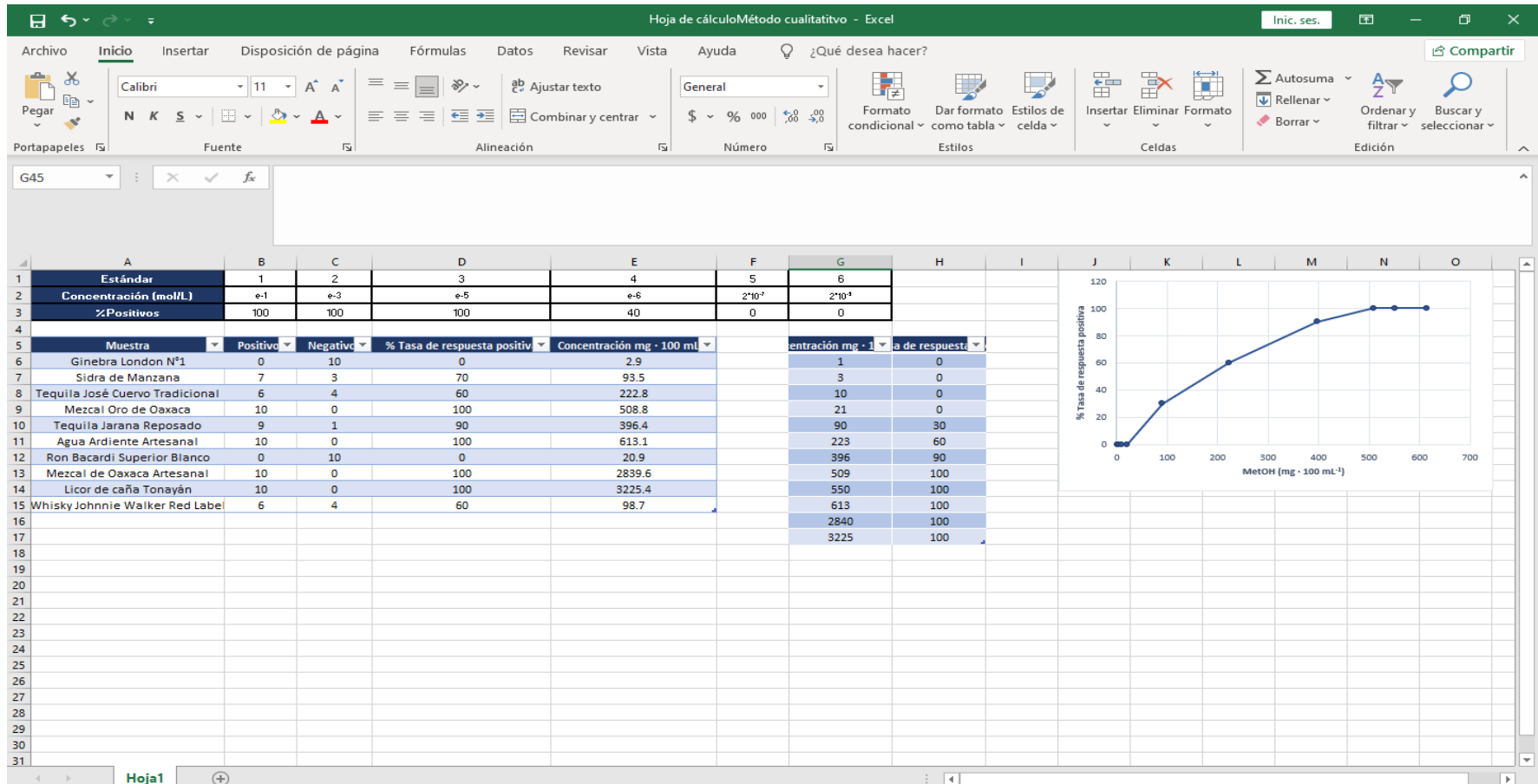
Método:	LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS		
Referencia:	NMX-V-021-1986		
Especificación de los requisitos de validación:	Obtener los parámetros de desempeño de la determinación cualitativa de metanol en bebidas alcohólicas		
Parámetro	Experimentación realizada	Ecuaciones de cálculo	Cualidad observable
Sensibilidad diagnóstica (SD)	Se consideró el número total de verdaderos positivos, a partir de la tasa de falsos negativos	$SD = \frac{\text{número de muestras verdaderos positivos}}{\text{número total de muestras con condición}}$	Pruebas positivas presencia de coloración violeta.
Especificidad diagnóstica (ED)	Se consideró el número total de verdaderos negativos, a partir de la tasa de falsos positivos	$ED = \frac{\text{número de muestras verdaderos negativos}}{\text{número total de muestras sin condición}}$	
Concentración de corte (CC)	Se prepararon disoluciones de metanol de distintas concentraciones a partir de un reactivo de grado analítico. Se realizó la prueba 10 veces	Probabilidad de respuestas positivas, P(x) y probabilidad de respuestas positivas más no concluyentes versus los niveles de concentración probados	
Precisión	Se midieron muestras de blanco con una concentración menor a la concentración de corte. Se realizó la prueba 30 veces.	$TFP = \frac{\text{número de muestras positivas por debajo de la CC}}{\text{número total de muestras por debajo de la CC}}$ $TFN = \frac{\text{número de muestras negativas por encima de la CC}}{\text{número total de muestras por encima de la CC}}$	




Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

III. Hoja de cálculo de la validación



	Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico	AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15
---	--	--

VI. Informe de validación

Informe de validación

AEIII-IVY
Revisión: 00
Fecha: 2018-11-05
Página 1 de 1

										Fecha de Actualización:	2020-05-12			
Clave y nombre del procedimiento validado:							AEIII-FTO-IVV							
Validación de la determinación de metanol en bebidas alcohólicas: método cualitativo														
Referencias normativas:		NOM-142-SSA1/SCFI-2014			NOM-142-SSA1-1995			NMX-V-021-1986						
Realizado por:	Alcántara Manjarrez Luis Enrique													
Especificación de los requisitos														
Método químico colorimétrico aplicado a bebidas alcohólicas para de la determinación de metanol, por medio de la reacción con el ácido cromotrópico														



Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

Informe de validación

AEIII-IVV
Revisión: 00
Fecha: 2018-11-05
Página 1 de 2

										Fecha de Actualización: 2020-05-12	
Clave y nombre del procedimiento validado:										AEIII-FTO-IVV	
										Validación de la determinación de metanol en bebidas alcohólicas: método cualitativo	
Referencias normativas:		NOM-142-SSA1/SCFI-2014			NOM-142-SSA1-1995			NMX-V-021-1986			
Realizado por:		Alcántara Manjarrez Luis Enrique									
Periodo de realización:		2019-1									
Equipo:		NA									
Materiales de referencia											
MRC (%S)	Clave	Lote	Marca	Uso	MRC (%S)	Clave	Lote	Marca	Uso		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	MRC		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	MRC		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	Confirmación en matriz		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	Confirmación en matriz		
NA	NA	NA	NA	Calibración							
Parámetros de validación											
Parámetro				Valor obtenido				Criterio de aceptación			
Sensibilidad diagnostica (SD)				100%				NA			
Especificidad diagnostica (ED)				60%				NA			
Presión				TFP				30%			
				TFN				0%			




Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

Informe de validación

AEIII-IVY
Revisión: 00
Fecha: 2018-11-05
Página 1 de 2

										Fecha de Actualización:		2020-05-12	
Clave y nombre del procedimiento validado:				Validación de la determinación de metanol en bebidas alcohólicas: método cualitativo									
Referencias normativas:				NOM-142-SSA1/SCFI-2014			NOM-142-SSA1-1995			NMX-V-021-1986			
Realizado por:		Alcántara Manjarrez Luis Enrique											
Declaración de la validación													
<p>El método es adecuado para el uso previsto (detección de metanol) por medio de la prueba a la gota, las características de desempeño evaluadas cumplen con lo especificado en la guía eurachem, la diferencia a la establecida en la NMX-V-021-1986 es la cantidad de gotas de la disolución de ácido fosfórico, permanganato de potasio y bisulfito de sodio.</p>													

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

V. Ejemplo de análisis de muestras

Datos del Solicitante

Cliente:	Campiriña		
Dirección:	Laboratorio 3B, Facultad de Química UNAM		
Contacto:	Ing. Luna		
Teléfono:	55 55 55 55 55	Correo electrónico:	campirina@yahoo.com

Recepción de las muestras:


Fecha:	2019/02/01
Número de muestras:	10
Preservación adecuada:	Cada una de las muestras fue almacenada en su envase de origen, a temperatura ambiente y en un lugar donde no fuera afectada por la luz
Observaciones:	Algunas muestras no presentan etiquetas y provienen en envases de venta a granel. Las muestras ya fueron entregadas destiladas y listas para el análisis

Métodos analíticos

No.	Ensayo	Norma o método de referencia (cuando aplique)
1	Determinación de metanol, método cualitativo	NMX-V-021-1986

Información de las muestras

No.	Muestra	Matriz	Ensayos
1	Ginebra London N°1	Bebida alcohólica destilada	Determinación de metanol, método cualitativo
2	Sidra de Manzana		
3	Tequila José Cuervo Tradicional		
4	Mezcal Oro de Oaxaca		
5	Tequila Jarana Reposado		
6	Agua Ardiente Artesanal		
7	Ron Bacardí Superior Blanco		
8	Mezcal de Oaxaca Artesanal		
9	Licor de caña Tonayán		
10	Whisky Johnnie Walker Red Label		

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

Resultados analíticos

Determinación de Metanol en una muestra comercial de alcohol mediante el método cualitativo	
Analista (s):	Luis Enrique Alcántara Manjarrez
Fecha de análisis:	2019/02/06

No.	Muestra	Presencia de metanol
1	Ginebra London N°1	Negativa
2	Sidra de Manzana	Negativa
3	Tequila José Cuervo Tradicional	Positiva
4	Mezcal Oro de Oaxaca	Positiva
5	Tequila Jarana Reposado	Positiva
6	Agua Ardiente Artesanal	Positiva
7	Ron Bacardí Superior Blanco	Negativa
8	Mezcal de Oaxaca Artesanal	Positiva
9	Licor de caña Tonayán	Positiva
10	Whisky Johnnie Walker Red Label	Negativa


Observaciones analíticas:	En caso de prueba positiva en el ensayo cualitativo es recomendable realizar la confirmatoria cuantitativa
---------------------------	--

Liberación del informe

Los resultados de los ensayos informados se realizaron con los métodos y procedimientos aquí asentados.

Luis Enrique Alcántara Manjarrez

Nombre y firma

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	---	---

Anexo II. Portafolio de evidencias. Método cuantitativo

VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS: UN ENFOQUE DOCENTE

Cuadro de aprobación	
Elaboración:	Luis Enrique Alcántara Manjarrez
Revisión:	Norma Ruth López Santiago
Aprobación:	Norma Ruth López Santiago
Semestre:	2020-2



Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

I. Protocolo normalizado de trabajo

1. Alcance

Método químico colorimétrico aplicado a bebidas alcohólicas para de la determinación de metanol, por medio de la reacción con el ácido cromotrópico.

2. Principio

El método se basa en la oxidación del metanol a formaldehído por acción del permanganato de potasio en medio ácido. El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico para producir un complejo en condiciones ácidas. La absorbancia del compuesto alcanza su pico a 575 nm. El metanol es un alcohol que se encuentra presente en todas las bebidas en mayor o menor proporción inclusive en trazas. Proviene de la hidrólisis de las pectinas, de las materias primas vegetales que se fermentan, de importancia ya que presenta una alta toxicidad para el ser humano.

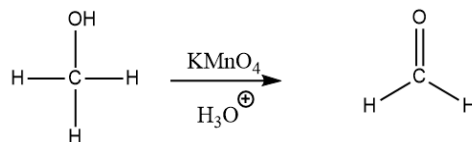


Figura 1. Oxidación de metanol a formaldehído

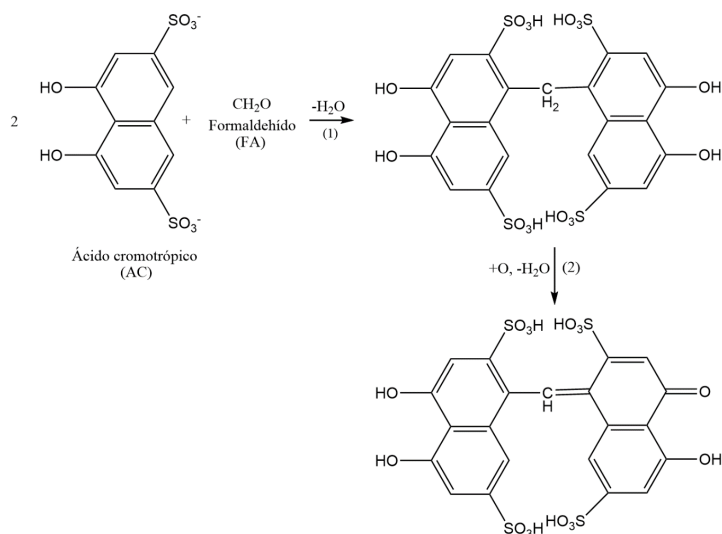



Figura 2. Propuesta de mecanismo entre el formaldehído y el ácido cromotrópico


	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha:2019/01/15</p>
---	---	--

3. Referencias normativas

- NORMA Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- NMX-V-021-1986. Bebidas alcohólicas destiladas. Determinación de metanol. Distillated alcoholic beverages. Determination of methanol. Normas mexicanas. Dirección general de normas.

4. Definiciones

- **Aditivos alimenticios:** sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o su conservación.
- **Alcohol etílico:** producto obtenido por fermentación, principalmente alcohólica de los mostos de las materias primas de origen vegetal que contienen azúcares o de aquellas que contienen almidones sacarificables y que dichos mostos fermentados son sometidos a destilación y rectificación. Su fórmula es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$.
- **Bebida alcohólica:** aquella obtenida por fermentación, principalmente alcohólica de la materia prima vegetal que sirve como base utilizando levaduras del género *Sccharomyces*, sometida o no a la destilación, rectificación, redestilación, infusión, maceración o cocción en presencia de productos naturales, susceptibles de ser añejadas, que pueden presentarse en mezclas de bebidas alcohólicas y pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos por la secretaría, con una graduación alcohólica de 2% a 55% en volumen a 20°C.
- **Bebida alcohólica destilada:** producto obtenido por destilación de líquidos fermentados que se hayan elaborado a partir de materias primas vegetales en las que la totalidad o una parte de sus azúcares fermentables, hayan sufrido como principal fermentación, la alcohólica, siempre y cuando el destilado no haya sido rectificado totalmente, por lo que el producto deberá contener las sustancias secundarias formadas durante la fermentación y que son características de cada bebida, con excepción del vodka, susceptibles de ser abocadas y en su caso añejadas o maduradas, pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

- **Bebida alcohólica fermentada:** producto resultante de la fermentación principalmente alcohólica de materias primas de origen vegetal, pueden adicionarse de ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Bebidas alcohólicas preparadas y cócteles:** productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, fermentadas, licores genuinos o mezclas de ellos, pueden adicionarse de otros ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Bebidas alcohólicas preparadas y cócteles:** productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, fermentadas, licores genuinos o mezclas de ellos, pueden adicionarse de otros ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Buenas prácticas de fabricación:** conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su consumo.
- **Coadyuvante de elaboración:** sustancia o materia que no se consume como ingrediente alimenticio por sí misma, y se emplea intencionalmente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes, para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración, pudiendo dar lugar a la presencia no intencionada, pero inevitable, de residuos o derivados en el producto final.
- **Ingrediente:** cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, que se empleen en la fabricación o preparación de un alimento o bebida no alcohólica y esté presente en el producto final, transformado o no.
- **Licores:** productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, espíritu neutro, alcohol de calidad o común o mezcla de ellos y agua, aromatizados y saborizados con procedimientos específicos y a los cuales pueden agregarse ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría.
- **Límite máximo:** cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se deben exceder en un alimento, bebida o materia prima.
- **Lote:** Cantidad de un producto elaborado en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad.



Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

- **Métodos de prueba:** procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.
- **Repetibilidad:** es la precisión del sistema y es expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes de una misma preparación estándar bajo las mismas condiciones.
- **Reproducibilidad:** es la precisión del método analítico y manifiesta la concordancia entre determinaciones independientes de una muestra homogénea del material que esté analizando bajo las mismas condiciones experimentales e introduciendo factores de variación; tiempo, analistas y equipos.
- **Calibración:** el conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones.

Se puede hablar de dos tipos de calibración, las cuales son:


CALIBRACIÓN INSTRUMENTAL	CALIBRACIÓN ANALÍTICA
<i>Comprobación del funcionamiento correcto del instrumento o equipo</i>	Caracterización de la respuesta instrumental en función de las propiedades del analito
<i>Su objetivo es corregir la respuesta instrumental de un equipo</i>	Su objetivo es establecer la relación entre la señal y una propiedad del analito
<i>Misma magnitud medida que la del patrón</i>	La magnitud medida es distinta que la magnitud conocida del patrón
<i>El patrón no contiene el analito</i>	El patrón contiene el analito

5. Interferencias

No se reporta la existencia de alguna interferencia para este método, incluso si el acetaldehído está presente en grandes proporciones.

6. Medidas de seguridad

En todo momento se debe de utilizar anteojos y guates de seguridad, así como una bata de algodón. Además, para la manipulación de reactivos peligrosos se deberá utilizar la campana de extracción.

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

7. Materiales y equipos

Materiales


- Matracas volumétricos de 10 mL
- Espátula
- Agitador de vidrio
- Parrilla de calentamiento y agitación
- Probeta de 25mL
- Celdas de plástico de 1 cm para mediciones de absorbancia
- Vasos de precipitados de diferente volumen
- Pipetas volumétricas 5,10 y 15 mL
- Tubos de ensaye
- Pipetas Pasteur

Equipos

- Espectrofotómetro Vernier SpectraVis Plus GDX-SVISPL con un intervalo de longitud de onda: 380 nm-950 nm.
- Celdas de plástico de 1 cm para todas las mediciones de absorbancia.
- Micropipetas Transferpette® Brand de 20-100 uL, 100-1000 uL.
- Una balanza analítica Ohaus con sensibilidad de 0.0001g.

8. Reactivos, estándares y materiales de referencia

- Bisulfito de Sodio (NaHSO_3)
- Ácido cromotrópico de Meyer
- Permanganato de potasio (KMnO_4) de Meyer con ensayo $\geq 99.9\%$
- Ácido fosfórico (H_3PO_4) de J.T. Bakercon una pureza del 85,0- 87,0 %
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) de J.T. Bakercon una pureza del 95.0 - 98.0 %
- Metanol (CH_3OH) de J.T. Bakercon $\geq 99.9\%$
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) de J.T. Bakercon $\geq 99.9\%$
- Disolución de alcohol etílico al 5,5% Alc. Vol: Se midió 5.5 mL de etanol y se llevó a un aforo de 100bmL con agua destilada.
- Disolución de permanganato de potasio (KMnO_4) en ácido fosfórico (H_3PO_4): Se pesaron y se disolvieron 0.3 g de KMnO_4 con 1.5 mL de H_3PO_4 en un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó al aforo con agua destilada (Esta disolución se debe preparar por lo menos cada mes).

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

- Disolución acuosa al 5% de ácido cromotrópico: Se pesaron y se disolvieron 0.5 g de ácido cromotrópico y se llevó al aforo con agua destilada (Debe prepararse por lo menos cada semana y filtrarse si presenta turbiedad al momento de utilizarse).
- Disolución patrón de metanol al 0,025% v/v en solución alcohólica al 5,5% de etanol: Se midió 0.025 mL (25 µL) con una micropipeta y se llevó a un aforo de 100 mL de la disolución de alcohol etílico al 5,5%.

9. Recolección, preservación y almacenamiento de Muestras

- Las muestras que se manipulen deben de estar previamente destiladas.
- Las muestras utilizadas deberán ser envasadas y almacenadas en un lugar seco.

10. Control de calidad

- El blanco en la realización de cada curva se efectuará como un control de calidad al tener una lectura de 0

11. Calibración

Poner 200 µL de la disolución de permanganato en ácido fosfórico en distintos matraces volumétricos de 10 mL, colocándolo en un baño de hielo, adicionar las alícuotas respectivas para preparar una curva patrón de 150-600 mg · 100 mL⁻¹ de calibración volúmenes de la disolución patrón 300 mg · 100 mL⁻¹ fría, y dejar reposar 30 minutos en el baño de hielo. Decolorar con un poco de bisulfito de sodio sólido y agregar 100 µL de disolución de ácido cromotrópico al 5%. Agregar lentamente, gota a gota, 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo escurrir por las paredes del matraz, agitando constantemente, y colocar en baño maría entre 60 y 75 °C durante 15 minutos. Enfriar y adicionar con agitación agua hasta un volumen próximo al aforo, enfriar a temperatura ambiente y llevar al aforo con agua, homogeneizar y reposar durante 5 minutos. Las mediciones se hacen a una longitud de onda de 575 nm.



Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

12. Procedimiento

Aplicación a muestras: Se colocan 200 μL de la disolución de permanganato de potasio en ácido fosfórico en distintos matraces volumétricos de 10 mL, colocados en un baño de hielo, adicionar 100 μL de la muestra fría, y dejar reposar 30 minutos en el baño de hielo. Decolorar con un poco de bisulfito de sodio sólido y agregar 100 μL de disolución de ácido cromotrópico al 5%. Agregar lentamente, gota a gota, 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo escurrir por las paredes del matraz, agitando constantemente, y colocar en baño maría entre 60-75°C durante 15 minutos. Enfriar y adicionar con agitación agua hasta un volumen próximo al aforo, enfriar a temperatura ambiente y llevar al aforo con agua, homogeneizar y reposar durante 5 minutos.


Tabla 1. Volúmenes utilizados para la elaboración de la curva de calibración

Estándar	Vol. Stock agregado (μL)	Conc. stock $\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$
Blanco	0	0
1	50	150
2	75	225
3	100	300
4	120	360
5	140	420
6	160	480
7	180	540
8	200	600

13. Cálculos

Para cambiar los valores de absorbancia a concentración utilizando las curvas de calibración y se utilizan los parámetros m y b de la curva mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} - b}{m}$$


	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
--	---	---

14. Informe

La concentración de metanol encontrada en las muestras se informa en $\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$

Anexo 1. Identificación de cambios

Punto	Página	Cambio(s)
NA	NA	NA

	Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico	AEIII-clave Revisión: 00 Fecha:2019/01/15
---	--	---

II. Plan de validación

Método:	LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS		
Referencia:	NOM-142-SSA1-1995		
Especificación de los requisitos de validación:	Obtener los parámetros de desempeño de la determinación cuantitativa de metanol en bebidas alcohólicas		
Parámetro	Experimentación realizada	Ecuaciones de cálculo	Criterio de aceptación
Intervalo lineal	Preparar disoluciones para realizar la curva de calibración a partir de la disolución estándar, incluyendo el blanco y con 5-6 niveles de concentración	Coeficiente de correlación (r) al cuadrado r^2	$r^2 \geq 0.98$
Sensibilidad analítica	Realizar el ensayo por triplicado. Leer el blanco. Leer las disoluciones estándar. Realizar el ajuste de la curva por mínimos cuadrados de la respuesta del equipo en función de la concentración del analito	Pendiente: m	m > 0
Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	Realizar mínimo 6 medidas replicadas de la concentración más baja con la que trabajo en la curva de calibración	$LDD = 3S'$ $LDC = 6S'$ S es la desviación estándar de la medición instrumental del analito	LC debe ser menor a la concentración más baja del intervalo lineal y el LD más bajo que el LC
Exactitud como Recobro	Se prepararon 6 disoluciones diferentes a la concentración intermedia del intervalo lineal	$\%R = \frac{Conc. \text{ exp }}{Conc. \text{ teórica}} \times 100$	97-103%
Repetibilidad	Se prepararon 6 disoluciones diferentes a la concentración intermedia del intervalo lineal en periodos de tiempo diferentes	Desviación estándar relativa	DER < 5%
Reproducibilidad	Se prepararon 6 disoluciones diferentes a la concentración intermedia del intervalo lineal en periodos de tiempo diferentes	Desviación estándar relativa	DER < 5%



Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha:2019/01/15

III. Hoja de cálculo de la validación


The screenshot shows an Excel spreadsheet titled "Hoja de cálculo Método cuantitativo - Excel". The spreadsheet is organized into columns for concentration (Concentración), absorbance (Abs), and calculated values (Medi). The data points are as follows:

Concentración	Abs	Medi
0	0	0
125	0.053	0.05169
225	0.0783	0.07801
300	0.09066	0.09282
360	0.1215	0.1198
420	0.1356	0.13564
480	0.154	0.154
540	0.17	0.17
600	0.187	0.1866

The calibration curve graph shows the relationship between Absorbance (Absorbancia) and Methanol concentration (MeOH (mg · 100 mL⁻¹)). The equation of the line is $y = 0.0003x + 0.0082$ with $R^2 = 0.9994$.

The spreadsheet also includes a table for the determination of detection and quantification limits:

Parámetro	Valor
Mediana	0.0602
Desviación	0.0016
DER	2.73
LDC	32.3
LDQ	16.4

	<p>Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p>AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
--	---	---

IV. Informe de validación

Informe de validación

AEIII-IVV
Revisión: 00
Fecha: 2018-11-05
Página 1 de 1

										Fecha de Actualización:		2020-05-12	
Clave y nombre del procedimiento validado:										AEIII-FTO-IVV			
Validación de la determinación de metanol en bebidas alcohólicas: método cuantitativo													
Referencias normativas:		NOM-142-SSA1/SCFI-2014			NOM-142-SSA1-1995			NMX-V-021-1986					
Realizado por:		Alcántara Manjarrez Luis Enrique											
Especificación de los requisitos													
Método químico colorimétrico aplicado a bebidas alcohólicas para de la determinación de metanol, por medio de la reacción con el ácido cromotrópico													




Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

Informe de validación

AEIII-IVV
Revisión: 00
Fecha: 2018-11-05
Página 1 de 2

										Fecha de Actualización: 2020-05-12	
Clave y nombre del procedimiento validado:										AEIII-FTO-IVV	
										Validación de la determinación de metanol en bebidas alcohólicas: método cuantitativo	
Referencias normativas:		NOM-142-SSA1/SCFI-2014			NOM-142-SSA1-1995			NMX-V-021-1986			
Realizado por:		Alcántara Manjarrez Luis Enrique									
Periodo de realización:		2019-1									
Equipo:		Espectrofotómetro Vernier SpectraVis Plus GDX-SVISPL con rango de longitud de onda: 380 nm - 350 nm.									
Materiales de referencia											
MRC (%S)	Clave	Lote	Marca	Uso	MRC (%S)	Clave	Lote	Marca	Uso		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	MRC		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	MRC		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	Confirmación en matriz		
NA	NA	NA	NA	Calibración	NA	NA	NA	NA	Confirmación en matriz		
NA	NA	NA	NA	Calibración							
Parámetros de validación											
Parámetro		Valor obtenido				Criterio de aceptación					
Intervalo de concentraciones		150-600 mg · 100 mL ⁻¹				150-600 mg · 100 mL ⁻¹					
Coefficiente de correlación r		0.9971				≥0.98					
Coefficiente de determinación r²		0.9944				≥0.98					
Sensibilidad analítica		0.0030				≥0					
Límite de detección		10.4				LDD < Conc. Min.					
Límite de cuantificación		5.2				LDC < LDD					
% Recobro (indicar al nivel de)		98.40%				97-103%					
Precisión (indicar el nivel de concentración al que se lleva a cabo)		Repetibilidad (DER)				3.50					
		Intermedia (DERPI)				2.97					
PAPIIME PE201618 Enseñanza de la validación de métodos analíticos											

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha:2019/01/15</p>
--	--	--

Informe de validación

AEIII-IVV
Revisión: 00
Fecha: 2018-11-05
Página 1 de 2

										Fecha de Actualización		2020-05-12		
Clave y nombre del procedimiento validado:				Validación de la determinación de metanol en bebidas alcohólicas: método cuantitativo										
Referencias normativas:		NOM-142-SSA1/SCFI-2014			NOM-142-SSA1-1995			NMX-V-021-1986						
Realizado por:		Alcántara Manjarrez Luis Enrique												
Declaración de la validación														
<p align="center">El método es adecuado para el uso previsto (detección de metanol), las características de desempeño evaluadas cumplen con lo especificado en la guía eurachem, el método cumple con tener un intervalo lineal de trabajo, al igual presenta una alta sensibilidad $m \neq 0$. La NOM-142-SSA1-1995 indica que la diferencia entre resultados sucesivos obtenidos en las mismas condiciones para una sola muestra, no debe exceder del 5% del promedio de las mismas. En el método se cumple con diferencias menores al 5%.</p>														

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha:2019/01/15</p>
---	--	--

V. Ejemplo de análisis de muestras

Datos del Solicitante

Cliente:	Campiriña		
Dirección:	Laboratorio 3B, Facultad de Química UNAM		
Contacto:	Ing. Luna		
Teléfono:	55 55 55 55 55	Correo electrónico:	campirina@yahoo.com

Recepción de las muestras:


Fecha:	2019/02/01
Número de muestras:	10
Preservación adecuada:	Cada una de las muestras fue almacenada en su envase de origen, a temperatura ambiente y en un lugar donde no fuera afectada por la luz
Observaciones:	Algunas muestras no presentan etiquetas y provienen en envases de venta a granel. Las muestras ya fueron entregadas destiladas y listas para el análisis

Métodos analíticos

No.	Ensayo	Norma o método de referencia (cuando aplique)
1	DETERMINACIÓN DE METANOL, MÉTODO CUANTITATIVO	NOM-142-SSA1/SCFI-2014

Información de las muestras

No.	Muestra	Matriz	Ensayos
1	Ginebra London N°1	Bebida alcohólica destilada	Determinación de metanol, método cuantitativo
2	Sidra de Manzana		
3	Tequila José Cuervo Tradicional		
4	Mezcal Oro de Oaxaca		
5	Tequila Jarana Reposado		
6	Agua Ardiente Artesanal		
7	Ron Bacardí Superior Blanco		
8	Mezcal de Oaxaca Artesanal		
9	Licor de caña Tonayán		
10	Whisky Johnnie Walker Red Label		

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

Resultados analíticos

<p align="center">Determinación de Metanol en una muestra comercial de alcohol mediante la técnica de UV-Vis</p>	
Analista (s):	Luis Enrique Alcántara Manjarrez
Fecha de análisis:	2019/02/21

No.	Muestra	Concentración mg · 100 mL⁻¹
1	Ginebra London N°1	<LDC
2	Sidra de Manzana	93.5
3	Tequila José Cuervo Tradicional	222.8
4	Mezcal Oro de Oaxaca	508.8
5	Tequila Jarana Reposado	396.4
6	Agua Ardiente Artesanal	613.1
7	Ron Bacardí Superior Blanco	20.9
8	Mezcal de Oaxaca Artesanal	2839.6
9	Licor de caña Tonayán	3225.4
10	Whisky Johnnie Walker Red Label	98.7

Observaciones analíticas:	Ninguna
---------------------------	---------

Liberación del informe

Los resultados de los ensayos informados se realizaron con los métodos y procedimientos aquí asentados.

Luis Enrique Alcántara Manjarrez

Nombre y firma



**Protocolo para la determinación de metanol
en bebidas alcohólicas usando el método
colorimétrico del ácido cromotrópico**

AEIII-clave
Revisión: 00
Fecha: 2019/01/15

Anexo III. Notas de apoyo docente

En este anexo, se describen de forma general las notas de apoyo al docente. En el primer apartado se presentan las recomendaciones generales tanto teóricas como prácticas para apoyo del docente, en el segundo, se describen a detalle las metodologías considerando diferentes escenarios que puedan darse durante su aplicación. Por último, se presentan las diferentes medidas de seguridad que el docente deberá aplicar para salvaguardar la integridad de los estudiantes.

1. Recomendaciones generales

Previo a la experimentación se recomienda al docente realizar una guía básica a los estudiantes de una revisión bibliográfica, la cual constituye una etapa fundamental del proyecto de investigación y debe garantizar la obtención de la información más relevante.

Para realizar de manera óptima se recomienda que la selección de muestras sea de muestras de bebidas alcohólicas transparentes, o con muy poca coloración, ya que estas requerirán un proceso de destilación previo.

En la imagen 1c, se puede observar una guía que el docente puede seguir para identificar la presencia de metanol en las bebidas alcohólicas con forme a la coloración que presentan las muestras, conforme esta aumenta la presencia de metanol también.




Imagen 1C. Aumento en la coloración en presencia de metanol en las bebidas alcohólicas

2. Recomendaciones experimentales

Método cualitativo

Para poder realizar la determinación cualitativa de metanol en bebidas alcohólicas se debe de hacer una planeación previa respecto a los volúmenes de las disoluciones que se prepararan, ya que al consultar en la normatividad proporcionada se utilizan volúmenes demasiado grandes, y por ende se generarán demasiados residuos.

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

De esta manera se da pie a la siguiente metodología donde es de suma importancia seguir los puntos firmemente:

Como primer paso, en un tubo de ensayo se colocan dos gotas de la muestra, posteriormente se agrega una gota de disolución de ácido fosfórico (1:20) mol/L y una o dos de disolución de permanganato de potasio (1:20) mol/L, se mezcla cuidadosamente y se deja reposar la mezcla durante un minuto. Se agregó la disolución acuosa de bisulfito de sodio (1:20) mol/L, gota a gota y agitando, hasta que el color violeta del permanganato de potasio desaparezca (si la mezcla presenta una coloración café, se deben agregar gotas de disolución acuosa de ácido fosfórico (1:20) mol/L hasta la desaparición el color), a la disolución incolora resultante, se le agregan 5 mL de la disolución de ácido cromotrópico, y se calienta la mezcla en baño maría aproximadamente a 60°C durante diez minutos. En presencia de metanol se observa una coloración violeta/café.


Método cuantitativo

Para poder realizar la determinación cuantitativa de metanol bebidas alcohólicas se debe de hacer una planeación previa respecto a los volúmenes de las disoluciones que se prepararan, ya que al consultar en la normatividad proporcionada se utilizan volúmenes demasiado grandes, y por ende se generarán demasiados residuos.

De esta manera se da pie a la siguiente metodología donde es de suma importancia seguir los puntos firmemente:

Poner 200 μL de la disolución de permanganato de potasio en ácido fosfórico en distintos matraces volumétricos de 10 mL, colocándolo en un baño de hielo, adicionar las alícuotas respectivas para preparar una curva patrón de 150-600 $\text{mg}/100 \text{ mL}^{-1}$ de calibración volúmenes de la disolución patrón fría, y dejar reposar 30 minutos en el baño de hielo (es muy importante que al colocar el permanganato de potasio en ácido fosfórico junto con la disolución stock o muestra problema, estas se agiten previamente y se dejen los 30 minutos indicados, de esta manera se estará seguro de que se realizó de manera idónea la oxidación).

Una vez que pasó el tiempo establecido se da pie a decolorar con un poco de bisulfito de sodio sólido y se agregaron 100 μL de disolución de ácido cromotrópico al 5% agitando de manera que se mezclen bien, y a su vez se agregó lentamente, gota a gota, 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo escurrir por las paredes del matraz, agitando cada matraz constantemente, terminado el este paso los matraces se colocaron en baño maría entre 60 y 75 °C durante 15 minutos (debe tenerse precaución en este paso, ya que se produce una reacción exotérmica al

	<p align="center">Protocolo para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas usando el método colorimétrico del ácido cromotrópico</p>	<p align="right">AEIII-clave Revisión: 00 Fecha: 2019/01/15</p>
---	--	---

agregar el ácido sulfúrico, y al meterlos a baño María la temperatura no debe de pasar de los grados establecidos, ya que podría generarse un accidente).

Posteriormente los matraces se sacan del baño María y se dejan enfriar, después uno por uno se toma un matraz para adicionar con agitación agua hasta el volumen de aforo, se presentarán coloraciones en cada uno de ellos, pero esta se va perdiendo conforme se deja enfriar, por lo que es necesario se realizar las mediciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 575 nm inmediatamente, una vez terminada la lectura se prosigue con el siguiente matraz hasta finalizar todos.

Medidas de seguridad aplicadas

Las medidas de seguridad dentro del laboratorio, representan una parte fundamental del proceso. En este sentido, los alumnos deben de conocer los diferentes protocolos de seguridad para cada uno de los métodos, dentro de los cuales podemos encontrar hojas de seguridad, los cuidados específicos para cada compuesto químico, las diferentes reacciones que se pueden producir durante el proceso, así como el tratamiento de los residuos producidos.