

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Química

*"DESARROLLO DE UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC) DE ALCOHOL
EN GEL PARA FORTALECER LA NORMALIZACIÓN Y LA REGLAMENTACIÓN COSTARRICENSE
EN EL ACATAMIENTO DE LAS MEDIDAS SANITARIAS."*

Trabajo Final de Graduación presentado como requisito para optar por el grado de Licenciatura
en Química.

Fernando Aragón Mata

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

I-2023

Dedicatoria

*Para Caroline y Javier.
Que, a pesar de las dificultades,
colocaron a sus hijos como
prioridad. Cada meta alcanzada,
será fruto de ese esfuerzo.*

Agradecimientos

En este proyecto hubo una cantidad masiva de personas involucradas a las que les agradezco el tiempo, la atención y paciencia. Tengo claro que, sin el aporte desinteresado de tantas personas, esto no hubiese avanzado. Por esta razón, me queda una responsabilidad moral de, en algún momento, poder devolverle el favor a una persona que tenga la motivación para realizar algo similar. La cadena de este tipo de acciones hace de este mundo un lugar un poco mejor.

Al LCM le tendré eterno agradecimiento porque solo con verlos trabajar, con su profesionalismo y talento, he aprendido muchísimo. A Bryan y Jessica que en su momento me ayudaron a plantear el proyecto y me abrieron las puertas. A Jimmy Venegas que fue una guía infalible y le admiro su ecuanimidad ante los problemas y dedicación conmigo y el proyecto. A Gabriel Molina, siempre atento a consultas compartiendo a libro abierto todo su conocimiento. A Eric y Jennifer, su disposición a ayudar en lo que fuese necesario y su colaboración el día de producción. Les tengo a todos mucho respeto y admiración por la labor que realizan y el crecimiento que ha tenido el área. Son un grupo de trabajo muy completo y muy bonito.

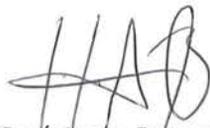
A Sur Química, donde me recibieron con brazos abiertos desde que salí de la Universidad, brindándome mi primera experiencia laboral y permitiendo el desarrollo de experimentos en el cromatógrafo, infrarrojo y sistema de destilación. Especialmente a Josué Solano, con sus bromas, la música y el espacio físico del lab instrumental para el desarrollo de este proyecto a pesar del desastre que dejaba siempre. A Giordí Fernández, por mover la parte administrativa y gerencial para los permisos del proyecto, a pesar de la tramitomanía, nunca me puso peros. A Gianluca Franco, don Francisco Quesada y toda la familia Giordano porque aprobaron el proyecto y permitieron el desarrollo del mismo. A Daniel Agüero y Piedra por la ayuda que me dieron, aunque sea con unas risas que me ayudaban a seguir adelante. Gracias por ser mi casa por tantos años, incluyendo la estabilidad que quisieron proveer a sus empleados en la pandemia.

A Paola Fuentes, mi directora de Tesis, que he matriculado no sé cuántos cursos con ella y no me canso de aprender de todo lo que sabe. Gracias por la disposición de ayudarme desde el inicio con los contactos del LCM que hicieron esto posible y también con respuestas a mis consultas no importa el día o la hora. Le prometo que luego de mil cursos que me dio, varias asistencias en las que le colaboré y la tesis; **la voy a dejar en paz y dejar de ser un pega...bueno, al menos que se me ocurra hacer una maestría. Si no me ha bloqueado, la contactaré!**

A mis padres y Sofi que me escuchaban cuando las cosas quizás no iban de la mejor manera, pero confiaban que podía hacerlo. A Adri por tener una sonrisa y unos ojos que todo lo curan, todo lo mejoran y hacen que me dé cuenta de lo realmente importante de la vida. Gracias Adri por creer en mí en cualquier cosa que hago. Tus palabras y verte feliz, me motivan a ser mejor persona. Los amo mucho a todos y todas. Por supuesto a Kenneth, Paula, Douglas, Pochi y Leo; que hicieron mi vida universitaria un pedazo de recuerdo. Gracias por las salidas, las risas, fotos, chismes y recuerdos que me llevo por siempre. Al puro final de esto, me agradezco a mí, porque este proyecto no fluyó siempre. Tuvo muchos altibajos, retrasos, documentos terminados que se dañaron, personas difíciles, equipos quisquillosos, tramites, permisos laborales, sábados invertidos y exceso de trabajo. Gracias por nunca darse por vencido, ni darse por menos, ni conformarse. Siga así.

"Este Trabajo Final de graduación fue aceptado por la Comisión de Trabajos Finales de graduación de la Escuela de química de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Química".

Aprobado por el Tribunal Examinador:



Juan José Araya Barrantes, Ph.D.
Presidente del Tribunal



Paola Fuentes Schweizer, M.Sc.
Directora del Trabajo Final de Graduación



Bryan Calderón Jiménez, Ph.D.
Asesor



Ing. Gabriel Molina Castro, Lic
Asesor



Jerson González Hernández, Ph.D.
Miembro del Tribunal



B.Q. Fernando Aragón Mata
Sustentante

Contenido

Resumen.....	7
Lista de cuadros.....	9
Lista de figuras	12
Lista de abreviaturas	16
Capítulo 1. Fundamento teórico.	17
1.1. Introducción.....	17
1.2. Antecedentes.....	18
1.3. Metrología y Materiales de Referencia	21
1.4. Fundamento teórico de los métodos de análisis cuantitativo.....	28
1.5. Alcohol en gel.....	36
Capítulo 2. Objetivos	40
2.1. Objetivo General	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
Capítulo 3. Metodología.....	41
3.1. Alianza Público-Privada.....	41
3.2 Validación de los métodos de ensayo.....	42
3.3. Preparación del lote del CMR.	47
3.4 Caracterización del CMR.	52
3.5 Estudios de Homogeneidad	57
3.6. Estudios de Estabilidad.	58
Capítulo 4. Resultados y Discusión.	60
4.1. Validación de Metodologías.....	60
4.1.1. Cromatografía de Gases – <i>FID</i>	60
4.1.2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier.....	67
4.2. Producción del Candidato a Material de Referencia.	73
4.3. Caracterización del contenido de etanol y pH del CMR.	74
4.4. Evaluación de homogeneidad del CMR.	76
4.5. Evaluación de la Estabilidad del CMR.	81
4.6. Valor de concentración, pH e incertidumbre finales para el CMR.	86
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones	89

Referencias.....	91
Anexos.....	97

Resumen

A raíz de la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 en 2019, se observó en el sistema nacional, una serie de carencias a nivel de regulaciones y controles existentes para aquellos productos desinfectantes personales que estaban directamente asociados a combatir el aumento acelerado de contagios en la pandemia, como pueden ser soluciones binarias alcohol-agua, toallas desinfectantes y principalmente, alcohol en gel. Este práctico y eficaz producto consta de una formulación sencilla principalmente formada por agua, etanol, glicerina y un espesante; el cual se aplica en manos para eliminar la presencia de virus y bacterias patógenas que puedan ingresar al organismo por contacto entre las manos con el rostro. Para que esto se cumpla, su concentración alcohólica (ya sea etanol o mezcla isopropanol-etanol) debe estar en un ámbito apropiado, que no estaba definido o regulado, ni tampoco lo estaban las metodologías analíticas asociadas para determinarlo. Lo anterior, presentaba un escenario de ambigüedad para los productores y el consumidor final, generando incerteza si el producto era garante de desinfección total y además si pudiese ser un irritante para la piel.

El estado costarricense, a través de diversas instituciones, define el ámbito de concentración alcohólica que deben tener para ser efectivo, así como el ámbito de pH apropiado, y lo plasma en la **reglamentación técnica "RTCR 501:2020"**. A este esfuerzo, se suma INTECO, desarrollando las metodologías analíticas asociadas a la determinación de la concentración alcohólica y el pH, con los códigos: **"INTEQ 184:2020"** e **"INTEQ 185:2020"**. De esta manera, cada productor tiene referencias para sus formulaciones y sus controles de calidad internos.

Pese al establecimiento de normas y reglamentos nacionales, aún queda una pieza faltante del sistema de calidad, el cual es la carencia de un material de referencia certificado en concentración alcohólica y pH que permita asegurar y brindar confianza a las mediciones realizadas a este tipo de productos. Es decir, estas propiedades químicas no pueden ser garantizadas y demostradas para ser comercializadas de manera justa; tema de especial interés en periodo pandémico y post-pandémico. En un intento para solventar el problema, el LCM en asociación con Sur Química S.A., se unen por medio de una Alianza Público-Privada para producir y certificar un material de referencia certificado de alcohol en gel, el cual pueda ser utilizado como herramienta metrológica en el campo de la química para asegurar la calidad de las mediciones analíticas realizadas, validación de procedimientos internos, identificación de puntos de mejora, ensayos de aptitud; entre otros.

El candidato a material de referencia (CMR) se fabricó en Sur Química S.A., en la planta de cosméticos, ubicada en La Uruca, el día lunes 24 de enero del 2022, con el procedimiento y formulación asociados al código 539-33800-900 versión 6 de fórmula, bajo la orden de producción OP-1716437 y el lote a granel: 000518329. Su control de calidad se aprobó con todos los análisis en ámbito conforme.

Para cuantificar el contenido alcohólico, se validaron dos metodologías de análisis, las cuales son cromatografía de gases con detector *FID* y espectrometría infrarroja con transformada de Fourier y acoplamiento *ATR (FTIR-ATR)*; así como la verificación del método de densimetría de oscilación armónica el cual fue previamente validado por el LCM. Todas las validaciones y verificaciones se llevaron a cabo con un Material de Referencia Certificado en etanol del NIST. Con respecto al pH, se utilizó un pHímetro con electrodo de membrana de vidrio de punta cónica, el cual fue calibrado y verificado con Materiales de Referencia Certificados trazables al NIST. Se obtuvo que el método de *GC-FID* es adecuado para el uso previsto según los parámetros de validación definidos. Para el caso del *FTIR-ATR*, los resultados concluyen que la técnica no es apropiada para la cuantificación de etanol al no cumplir los criterios de aceptación para los parámetros de veracidad, precisión e incertidumbre; por lo que no fue considerado para la

cuantificación de parámetros del MRC. Para el caso de densimetría, los resultados de la verificación fueron conformes según los parámetros de desempeño definidos en la validación.

La asignación de valores de concentración de etanol y pH para el CMR con su incertidumbre de medida asociada, se realizó en tres etapas: caracterización, estudios de homogeneidad (dentro y entre unidades) y estudios de estabilidad. La caracterización se realizó con seis muestras del lote, tomadas según un muestreo aleatorio. Se obtuvo un valor promedio de (61.5 ± 1.4) % fracción en masa expresada como porcentaje determinadas con *GC-FID*, y de (62.5 ± 1.3) % por el método de densimetría. Para el pH, se obtuvo un valor de (7.669 ± 0.025) . El estudio de homogeneidad se realizó entre botellas y dentro de la botella, tanto para contenido alcohólico (por densimetría) como para pH. Para el estudio entre unidades, se realizó el muestreo de doce ítems, para obtener un total de 24 destilaciones/muestras independientes. Asimismo, para el estudio de la misma botella se realiza para 4 ítems, muestreados de forma aleatoria, donde a cada botella se le toman 3 sub-muestras independientes para destilar y/o cuantificar. De esta manera se determina que el lote del CMR es homogéneo, en ambos parámetros. Finalmente, pero no menos importante, el estudio de estabilidad a corto plazo se realiza con un estudio isócrono a dos temperaturas (20 y 37) °C, con cuatro muestras por punto, por el transcurso de un mes. Luego del tiempo en la incubadora a las temperaturas objetivo, se mide su pH y se destilan para realizar mediciones por *GC-FID* y densimetría. Se concluye que el producto no presenta fenómenos de evaporación o pérdidas de etanol a las temperaturas del estudio. Además, se concluyó que es estable a las temperaturas y tiempos analizados.

Los datos obtenidos de la caracterización, estudios de homogeneidad y estabilidad son utilizados para determinar la incertidumbre combinada y expandida con un factor de cobertura de $k=2$, al 95 % de confianza aproximadamente. Al combinar los resultados de los dos métodos analíticos para contenido alcohólico, se concluye que su valor de etanol final reportado corresponde a (62.0 ± 3.3) % fracción en masa expresada como porcentaje, con un pH de (7.7 ± 0.2) . De esta manera, debidamente certificados los parámetros, se concluye que hay una transición de CMR a MR. Estos resultados indican que el ítem posee un valor confiable y caracterizado de forma robusta para garantizar la veracidad de las mediciones realizadas a este tipo de productos, así tener una mayor confianza de las propiedades químicas de interés del consumidor, completando el sistema aseguramiento de la calidad nacional.

Lista de cuadros

Cuadro I: Formulación propuesta por la OMS para la desinfección de manos efectiva.	38
Cuadro II: Información del cromatógrafo de gases y del espectrómetro infrarrojo a utilizar en la validación de metodologías y certificación del MR.	43
Cuadro III: Condiciones operativas del cromatógrafo programadas para la validación de metodologías y posterior medición de muestras.	44
Cuadro IV: Condiciones operativas del espectrómetro infrarrojo programadas para la validación de metodologías y posterior medición de muestras.	44
Cuadro V: Descripción de los requerimientos propuestos para los parámetros de desempeño a validar en cada método.	45
Cuadro VI: Materias primas utilizadas con su información de marca y lote, para producir el CMR.	47
Cuadro VII: Controles fisicoquímicos realizados al agua desionizada que sule la planta de cosméticos para la fabricación de sustancias, del 24 de enero 2022.	47
Cuadro VIII: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de selectividad, GC-FID.	61
Cuadro IX: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de linealidad, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.	63
Cuadro X: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de LC y LD, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.	63
Cuadro XI: Resultados obtenidos del equipo GC-FID para la determinación del sesgo contra el MRC en etanol.	64
Cuadro XII: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de veracidad, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.	64
Cuadro XIII: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de precisión, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.	65
Cuadro XIV: Resultados de la incertidumbre estándar de cada aporte, incertidumbre combinada y expandida (k=2). Unidades en fracción en masa expresada como porcentaje. Para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.	66
Cuadro XV: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de incertidumbre, GC-FID.	66

Cuadro XVI: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de selectividad, para el método de cuantificación de etanol por FTIR.....	69
Cuadro XVII: Resultados obtenidos del equipo FTIR-ATR para la determinación del sesgo contra el MRC en etanol.....	69
Cuadro XVIII: Resultados obtenidos para el parámetro de desempeño de sesgo, con el primer QC medido, para la validación del método por FTIR-ATR.....	70
Cuadro XIX: Resultados obtenidos para el parámetro de desempeño de sesgo, con el segundo QC medido, para la validación del método por FTIR-ATR.....	70
Cuadro XX: Resumen de resultados obtenidos para el parámetro de validación de precisión. Para el método de cuantificación de etanol por FTIR-ATR.....	71
Cuadro XXI: Resumen de los valores de la incertidumbre estándar de cada aporte, incertidumbre combinada y expandida (k=2). Unidades en fracción en masa expresada como porcentaje. Para el método de cuantificación de etanol por FTIR.....	72
Cuadro XXII: Resumen de resultados obtenidos para el parámetro de validación de incertidumbre. Para el método de cuantificación de etanol por FTIR.....	72
Cuadro XXIII: Resultados de control de calidad, obligatorios para liberación del producto y proceder con envasado*.....	73
Cuadro XXIV: Valor de concentración de etanol promedio obtenida para las mediciones expresado como porcentaje fracción en masa para las muestras destiladas de C1-C6 por duplicado, mediante GC-FID.....	75
Cuadro XXV: Valor de concentración de etanol promedio obtenida para las mediciones expresado como porcentaje fracción en masa para las muestras destiladas de H1-H12 por duplicado, mediante densimetría.....	75
Cuadro XXVI: Valor de pH promedio obtenido para las mediciones para las muestras de H1-H12 por duplicado.....	75
Cuadro XXVII: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor, para el estudio de homogeneidad entre unidades por densimetría.....	77
Cuadro XXVIII: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad entre botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR, por densimetría.....	78
Cuadro XXIX: Unidades muestreadas del CMR de alcohol en gel para el estudio de homogeneidad dentro botellas mediante densimetría.....	78

Cuadro XXX: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor, para el estudio de homogeneidad dentro de unidades por densimetría.	79
Cuadro XXXI: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad dentro de botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR, por densimetría.	79
Cuadro XXXII: Resultados del ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) para el análisis de homogeneidad entre unidades de pH.	80
Cuadro XXXIII: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad de pH entre botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR.	80
Cuadro XXXIV: Resultados del ANOVA para el análisis de homogeneidad dentro de unidades de pH.	81
Cuadro XXXV: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad dentro de botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR, por densimetría.	81
Cuadro XXXVI: Unidades muestreadas del CMR de alcohol en gel para el estudio de estabilidad en el valor de concentración con cromatografía de gases.	82
Cuadro XXXVII:	83
Cuadro XXXVIII:	84
Cuadro XXXIX: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor para la determinación de la igualdad a cero de la pendiente de la regresión en la determinación de estabilidad con densimetría.	85
Cuadro XL: Resultados obtenidos para la incertidumbre de estabilidad del valor de concentración de etanol en el CMR, con densimetría.	85
Cuadro XLI: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor para la determinación de la igualdad a cero de la pendiente de la regresión en la determinación de estabilidad para pH.	86
Cuadro XLII: Resultados obtenidos para la incertidumbre de estabilidad del valor de pH en el CMR.	86
Cuadro XLIII:	87
Cuadro XLIV: Valor obtenido de pH para el CMR y sus incertidumbres asociadas.	87

Lista de figuras

Figura 1: Relación lógica entre conceptos de metrología para usarse en estandarización de mediciones. Tomado de Escamilla, A (2014) ³⁵	22
Figura 2 A y B: Ejemplo de estudios de homogeneidad entre unidades y comparadas con el aporte de incertidumbre por caracterización. Tomado de Pauwels, J. (2001) ⁴³ . El último dato observado a la derecha en ambas figuras, representa la incertidumbre por caracterización.	25
Figura 3: Ejemplo de un estudio clásico de estabilidad, donde se observa la tendencia decreciente en masa de estabilidad en un material certificado en concentración de hierro a lo largo del tiempo. Tomado de: Arvizu, M. (2010) ⁴⁴	27
Figura 4: Columna de sílice fundida mostrando su recubrimiento de poliimida, el tubo de sílice fundida y su fase estacionaria la cual se encuentra unida por quimisorción. Tomado de: Rahman, M. (2015) ⁴⁴	29
Figura 5: Estructura base de una fase estacionaria de polisioxanos (A) y polietilenglicol (B).....	30
Figura 6: Esquema de un equipo de ionización por llama (FID). Tomado de Shimadzu (2020) ⁵³	31
Figura 7: Esquema de un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier. Tomado de Torres, M. (2010) ⁵²	31
Figura 8: Esquema de un electrodo para medición de pH, donde un potencial se establece en la membrana de vidrio sensible a los iones H ⁺ con respecto al electrodo de referencia. Tomado de: Cleal, M. (2008) ⁶³	35
Figura 9: Diagrama de un electrodo de vidrio típico, acoplado a un pHímetro para la determinación del pH. Tomado de Skoog, D.; (2014) ⁵⁰	36
Figura 10: Molécula del cloruro de benzalconio, donde se muestra su grupo funcional característico: un amonio cuaternario cargado positivamente. Ejemplo de un ingrediente activo de desinfectantes no alcohólicos.....	37
Figura 11: La fórmula preparada a base de cloruro de benzalconio como ingrediente activo, contra los productos comerciales C1, C2 y C3 los cuales son a base de alcohol (IPA, IPA+etanol y etanol). Es de notar que la formulación no alcohólica mostró mayor rendimiento antibacteriano tanto en zonas de inhibición como en cantidad de bacterias. Tomado de: Alhassan, H. (2021) ⁵⁰	37

Figura 12: Llamadas a centros toxicológicos de los Estados Unidos relacionadas al uso inapropiado de desinfectantes de manos a base de alcohol. Tomado de: Hakimi, A. (2020)⁵⁰...**38**

Figura 13: Ceremonia realizada en las instalaciones del LCM, participando de izquierda a derecha: el Dr. Bryan Calderón, MSc. Dahiana Marín (por el LCM); Sra. Victoria Hernández (ex-ministra del MEIC periodo 2018-2022); Ing. Allan Torres y B.Q. Fernando Aragón.....**41**

Figura 14: Ejemplo de algunos insumos y equipos críticos empleados para la producción del CMR: A) Caja de cartón para embalaje. B) Agitador industrial. C) Tina de acero y balanza de alta capacidad. D) Balanza granataria para pesaje de producto terminado botella y etiqueta. E) Balanza para pesaje de materias primas.**48**

Figura 15: Versión final de la etiqueta aprobada por LCM para la identificación y futura distribución del MRC.**48**

Figura 16: Tina utilizada para la producción del CMR, donde se observa el equipo de protección personal del operario y el encargado de producción, que en este caso corresponde a mí persona.**49**

Figura 17: Alistos que se brindó de los materiales en fórmula, exceptuando el agua desionizada que proviene de tuberías al igual que el etanol.**49**

Figura 18. A) Adición controlada de etanol sobre la balanza de plataforma, proveniente del tanque a través de las tuberías. B) Dispensor a 1200 revoluciones por minuto para mezclar el etanol, es de notar que se aprecia transparencia y consistencia líquida fluida.**50**

Figura 19. A) Producto a alta velocidad posterior a la adición de la trietanolamina, donde se observa un claro cambio de apariencia a viscosa y translúcida. B) Dispensor utilizado para este tipo de agitación, utilizado por su alta fricción.**50**

Figura 20: Propela de aspas utilizado para la agitación posterior a la adición de las cargas, propuesto para garantizar mayor homogeneidad del lote fabricado. Tiempo de agitación: dos horas.....**51**

Figura 21: Arreglo de balanza a nivel de la tubería conectada a la tina, con el ítem del CMR pesando 310.0 g de muestra por envasado utilizado.**51**

Figura 22: Encargado de producción tapando las botellas para proceder a sellar con liner inductivo.**52**

Figura 23. A) Producto envasado final, con un liner sellado por inducción garantizando cierre hermético. B) Cajas almacenadas en tarimas, numeradas según salían unidades de envasado, con su información de orden de producción, código y fabricante.**52**

Figura 24: Sistema de destilación simple utilizado en Sur Química para la destilación de las muestras. Las mangueras del condensador se encuentran unidas a un recirculador con agua helada.....	53
Figura 25: Electrodo de vidrio código: HI1053B, utilizado para determinar el pH del CMR.	55
Figura 26: Diagrama de flujo que sintetiza el proceso de caracterización de contenido de etanol por diferentes metodologías y de pH. Elaboración propia.	56
Figura 27: Esquema simplificado de la medición de homogeneidad dentro de botellas, donde se observa el muestreo de cuatro unidades y una separación en tres submuestras por unidad, para medir por triplicado. Elaboración propia.....	58
Figura 28: Esquema de los estudios de estabilidad a largo y corto plazo para el CMR de alcohol en gel fabricado. Elaboración propia.	59
Figura 29: Picos de etanol (tiempo de retención: 4.237 min) e isopropanol (tiempo de retención: 4.601 min) mostrando traslape en los puntos finales del pico de isopropanol, afectando una cuantificación múltiple de los alcoholes.	60
Figura 30: Curva de calibración obtenida a partir de cuatro estándares de concentración conocida como variable independiente y la razón de áreas entre el analito y el estándar interno, como variable dependiente para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.....	62
Figura 31: Diagrama de Ishikawa como representación gráfica de los aportes a la incertidumbre que tiene el proceso de medición. Elaboración propia.....	66
Figura 32: Representación gráfica de una curva de bracketing, mostrando el intervalo de aplicación definido por los dos patrones utilizados. Tomado de Cuadros, L. (2001) ⁷¹	67
Figura 33: Señales obtenidas de etanol (A) e IPA (B) en el ámbito de las señales de interés para la cuantificación. Tomado de Shimatzu (2020) ⁷²	68
Figura 34: Espectro infrarrojo obtenido de la muestra de etanol absoluto (rojo), comparado con el espectro infrarrojo de la base de datos de Shimatzu (negro). Se obtiene una similitud de 95.4 % con ambos espectros.....	68
Figura 35: Diagrama de Ishikawa como representación gráfica de los aportes a la incertidumbre que tiene el proceso de medición. Elaboración propia.....	72
Figura 36: a) Producto terminado en su envase etiquetado y liner inductivo. b) Bodega de almacenamiento de materiales de referencia del DMQ en el LCM, donde permanecen los envases en forma vertical y aislados de luz solar directa.	74

Figura 37: Regresión lineal esbozada a partir de los datos obtenidos de concentración de etanol en función del tiempo, con su ecuación asociada, estudio de estabilidad con cromatografía de gases. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.**83**

Figura 38: Regresión lineal esbozada a partir de los datos obtenidos de concentración de etanol en función del tiempo, con su ecuación asociada, para estudio de estabilidad con densimetría. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.**84**

Figura 39: Regresión lineal esbozada a partir de los datos obtenidos de pH en función del tiempo, con su ecuación asociada. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.**86**

Lista de abreviaturas

ATR: Attenuated Total Reflection (Reflectancia Total Atenuada).

BI PM: Bureau International des Poids et Mesures (Oficina Internacional de Pesos y Medidas).

CCSS: Caja Costarricense del Seguro Social.

CIPM: Comité International des Poids et Mesures (Comité Internacional de Pesos y Medidas).

CGPM: Conférence Générale des Poids et Mesures (Conferencia General de Pesos y Medidas).

CMR: Candidato a Material de Referencia.

CoViD-19: Corona Virus Disease (enfermedad del coronavirus).

DMQ: Departamento de Metrología Química, LCM.

FID: Flame Ionization Detector (Detector de Ionización por Llama).

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier).

GC: Gas Chromatography (Cromatografía de Gases).

INTECO: Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica.

IPA: Alcohol Isopropílico.

ISO: International Organization for Standardization (Organización Internacional de Estandarización).

LCM: Laboratorio Costarricense de Metrología

LOD: Limit of Detection (límite de detección).

LOQ: Limit of Quantification (límite de cuantificación).

MEIC: Ministerio de Economía, Industria y Comercio

MRC: Material de Referencia Certificado.

MS: Ministerio de Salud.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

QC: Quality Control (Control de Calidad, se refiere a un patrón de concentración conocida, utilizado como referencia de exactitud).

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2 (del inglés: síndrome respiratorio severo agudo, por coronavirus 2).

SI: Sistema Internacional de Unidades.

VIM: Vocabulario Internacional de Metrología.

Capítulo 1. Fundamento teórico.

1.1. Introducción

La salud de las personas es el aspecto más importante en relación con la calidad de vida que se tiene en la sociedad actual¹. Incluso desde que las personas se encuentran en gestación, los chequeos médicos y dietas recomendadas están asociadas a desarrollar y mantener la mejor salud tanto del feto como de la madre. Los requisitos de las industrias alimenticias en relación con su manipulación de los alimentos, entrenamiento de personas, refrigeración y transporte, surgen con el mismo fundamento: evitar a toda costa afecciones de salud en las personas. Todo el sistema de salud se ha construido de manera que haya cobertura desde que nacemos, hasta la tercera edad para fallecer dignamente. Se observa entonces, una solidez del sistema de salud presente en nuestro país, brindado por la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), que ha extendido su alcance a prácticamente la totalidad de la población costarricense, a través de los aportes tributarios de la clase trabajadora.

A pesar de esto, la enfermedad provocada por el virus *SARS-CoV-2*, que surgió en Wuhan, capital de la provincia china de Hubei, a finales del año 2019², vino a generar una gran afectación en el área médica del país. Este virus se expandió mundialmente provocando una de las pandemias más extensas y duraderas de los últimos tiempos. Su particularidad reside en la alta tasa de reproducción de epidemia³ (denominada tasa R), que provocó rápida expansión entre humanos y una consecuente mortalidad que generó grandes retos a las instituciones de salud. Costa Rica no estuvo exento de esta situación, al tener alto consumo de insumos médicos, personal de atención, camas de hospital, camas de Unidad de Cuidados Intensivos, medicamentos y demás; que dificultaron la dinámica **'normal' de sociedad**. El alcance del virus va más allá, incluso generó un aumento drástico en enfermedades mentales por los confinamientos masivos, la constante atención mediática relacionada al virus, la mortalidad de allegados⁴; y también problemas económicos a nivel país por la baja productividad, irregularidades laborales, nulo turismo, cierre de locales comerciales; entre otros. Esto no es más que una clara evidencia que justifica la frase inicial mencionada: no hay aspecto más relevante y que cause mayor impacto en nuestra sociedad, que la salud de las personas en general.

En consecuencia, diversos campos de la ciencia han estudiado y brindado su aporte para contener la enfermedad e intentar disminuir las consecuencias lo más que sea posible, a pesar de contar con el reciente desarrollo de un esquema de vacunación, el cual disminuye la severidad de los síntomas pero no los contagios⁵. Estudios relacionados al comportamiento y propagación del virus han demostrado que existen formas de reducir la tasa de contagio a través de esfuerzos personales, como por ejemplo: uso de mascarillas faciales, baja exposición de las personas en espacios públicos, distanciamiento social de 1.8 metros y muy importante, el uso de desinfectantes o sanitizantes de manos y superficies, como es el caso del alcohol en gel en concentraciones entre (60 y 80) % fracción en volumen⁶. Esto genera alto interés público ya que este tipo de productos o formulaciones químicas disminuyen el avance de la pandemia y permite laborar con menores riesgos de contagio.

Es por esta razón que ha habido un aumento sustancial en el consumo de sanitizantes de manos en el país y, por lo tanto, de productores emergentes. No obstante, durante la pandemia se encontró que el país no poseía una reglamentación técnica que definiera de forma oficial, y con criterio técnico, las características químicas y físicas que deben tener estos productos, para inocular adecuadamente sin ser irritantes o peligrosos a la población que los consume. Tampoco había metodologías de ensayo oficiales,

destinadas a cuantificar el contenido alcohólico de los sanitizantes de manos, de manera que la población tenga garantía y confianza de su uso en ámbitos apropiados de concentración; ni había pautas escritas sobre la competencia técnica de los manufactureros, establecidos o emergentes, para asegurar la calidad de sus productos. Es por esta razón que el 13 de julio del 2020, con colaboraciones del Ministerio de Salud (MS) y el Ministerio de Economía, Industria y Comercio (MEIC), se publica oficialmente el Reglamento Técnico RTCR 501:2020⁷, que establece ciertos requisitos, entre ellos: ámbitos de concentración en porcentaje en volumen de etanol, isopropanol o ambos; el ámbito de pH del desinfectante, algunas propiedades visuales y detalles de envasado y etiquetado. La cuantificación de estos valores químicos tiene asociadas sus respectivas metodologías, publicadas oficialmente el 15 de septiembre del 2020 (INTE Q-185:2020)⁸ y el 28 de agosto del 2020 (INTE Q-184:2020)⁹, para el pH y la concentración alcohólica respectivamente.

Con el fin de mejorar el sistema de aseguramiento y control de calidad que surge para estos productos para manos, este proyecto tuvo como finalidad desarrollar y caracterizar un material de referencia de alcohol en gel, certificado en su contenido de etanol y su valor de pH, que sea de provecho para que las compañías productoras puedan medir su capacidad técnica e instrumental tanto de personal de laboratorio como operario y así respaldar metrológicamente su cumplimiento con: 1. El reglamento técnico en RTCR 501:2020. 2. La calidad comprobada de sus mediciones, desarrollando el mercado competitivo. 3. La salud de las personas y 4. El aporte a controlar e intentar disminuir el golpe que ha generado la pandemia. Para este fin, se certificó la concentración de etanol mediante las metodologías de cromatografía de gases con detector *FID*, y densimetría de oscilación armónica. Además, su valor de pH fue medido caracterizado también según la norma INTE Q-185:2020⁸. Finalmente, se estimó la incertidumbre asociada a la cuantificación (caracterización), así como los aportes a la incertidumbre por concepto de estabilidad y homogeneidad del material, según lo dispuesto en la norma ISO 17034 y la Guía ISO 35¹⁰. El desarrollo de este proyecto se realizó en conjunto con el LCM y Sur Química S.A., a través de una Alianza Público-Privada acordada entre ambos que permitió el uso de equipos, insumos, instalaciones y personal técnico de ambas instituciones para llevar a cabo la manufactura del MR y su certificación.

Este trabajo está subdividido en diferentes capítulos resumidos de forma breve a continuación: el capítulo I corresponde al marco teórico donde se presentan conceptos y tópicos de relevancia para justificar la metodología y comprender la discusión de resultados; como antecedentes, la metrología y sus generalidades, los materiales de referencia, la incertidumbre, el alcohol en gel y sus generalidades y el fundamento teórico de las técnicas instrumentales a utilizar. Como capítulo II, se tiene el objetivo tanto general como específico del proyecto. Seguidamente el capítulo III expone la metodología experimental llevada a cabo para la manufactura del CMR, la validación de metodologías analíticas, la certificación de valores de etanol y pH; y su estimación de incertidumbre por cuantificación (caracterización), por estabilidad y por homogeneidad (entre y dentro de botellas). Posterior a eso, se presenta el capítulo IV que contiene los resultados y su respectiva discusión, además de la asignación de un valor de concentración de etanol y pH para el MRC, con su debida incertidumbre de medida. Finalmente, en el capítulo V exponen las conclusiones obtenidas y las recomendaciones a llevar a cabo para proyectos similares.

1.2. Antecedentes

A inicios de diciembre del 2019 se detectó en Wuhan (China) el primer caso de neumonía asociada a un nuevo tipo de coronavirus denominado *SARS-CoV-2*. Este virus del género *betacoronavirus* y subgénero *sarbecovirus*, posee un diámetro de (60 a 140) nm con espigas formadas por glicoproteínas

para anclarse a la membrana celular de los huéspedes, una envoltura viral de predominancia lipídica y un ARN viral que inserta en la célula huésped para replicarse y sintetizar proteínas que dan origen a nuevos virus⁵. El ARN viral se compone de 29903 nucleótidos y estudios de genómica, junto con la ubicación de los primeros casos (mercado de mariscos y animales salvajes), apuntan a la alta probabilidad de transmisión animal-humano, con una similitud del 96 % en la secuencia del *SARS-CoV-2* con otros coronavirus en murciélagos de la zona de Yunnan¹¹. Tras varios contagios en Wuhan y otras zonas aledañas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anuncia el 13 de enero del 2020 el primer caso importado en Tailandia¹² a pesar de que algunos países de Europa ya tenían casos pero no habían sido identificados en ese momento. El 11 de marzo del 2020 la OMS¹³ declara la enfermedad una pandemia, al registrar contagios positivos en 114 países. Al 25 de junio del 2023, se contabilizan en todo el mundo 550 millones de casos con 6.28 millones de fallecidos (sin contabilizar casos o muertes no reportados oficialmente), con una mortalidad cercana al 1.2 % (dato que se ha disminuido drásticamente por el efecto de las vacunas aprobadas, que disminuyen la mortalidad y hospitalización; además de la evolución hacia otras variantes menos mortales. No obstante, este porcentaje en el periodo pre-vacuna se encontraba cercano al 4 %. A partir de esos sucesos, la economía y la salud mental de las personas se vió gravemente afectada por los confinamientos masivos, las restricciones de tránsito local e internacional y los colapsos en hospitales públicos¹⁴.

Previo a completar las rondas de vacunación para toda la población **que restauraría una 'normalidad** humanitaria pre-*CoViD'*, se estudió la transmisión del virus con la finalidad de disminuir el contagio con medidas sanitarias correctas. Se concluyó que hay cuatro formas principales de transmisión viral entre humanos: sintomática, pre-sintomática, asintomática y ambiental. Respectivamente, corresponden a una transmisión de un paciente enfermo con síntomas marcados a paciente sano, de paciente enfermo que no ha manifestado síntomas a uno sano, transmisión de un paciente portador que no muestra síntomas a una persona sana y el contagio involuntario de una persona por contacto con superficies contaminadas y posterior contacto con las mucosas del rostro. Se estima que el contagio pre-sintomático es, por sí solo, causante del (33 a 50) % de los casos de *CoViD-19*, por lo que un aislamiento de pacientes enfermos es insuficiente para contener el progreso de la enfermedad¹⁵. Además, se tiene evidencia que el virus *SARS-CoV-2* se transmite por las microgotas que se exhalan al hablar, respirar, toser, estornudar que viajan en el aire y son inhaladas por un tercero; o que se depositan en superficies con la cual otra persona tendrá contacto¹⁶. Se ha demostrado que en superficies como cartón, cobre, acero inoxidable y plástico, el virus puede permanecer viable por periodos de hasta 48 horas¹⁷. Se torna, entonces, imperativo aislar pacientes enfermos y contactos cercanos recientes de estos, pero aún más necesario es la utilización de mascarillas y desinfección constante de manos y superficies para disminuir la probabilidad de contagio.

Los desinfectantes de manos, como el alcohol en gel, son productos de uso sencillo, práctico, rápido y efectivo para la inactivación de virus con envoltura lipídica⁶. Su uso como medida sanitaria se implementó tanto en zonas públicas (residenciales, locales comerciales, oficinas; por ejemplo), como para uso personal, por lo que ha habido un aumento masivo en la manufactura y consumo. Por ejemplo, en Italia las ventas de alcohol en gel aumentaron en 561 % con respecto al mismo periodo del año 2019¹⁸ y es un ejemplo representativo de la tendencia mundial hacia estos productos. Formulaciones propuestas por la OMS constan de isopropanol y/o etanol en concentraciones en porcentaje en volumen de (70 a 80) %, 0.75 % de glicerina, 0.125 % de peróxido de hidrógeno y utilizando agua como disolvente¹⁹. Estas formulaciones se comprobaron totalmente efectivas para la inactivación del virus del *CoViD-19* en 30 segundos¹⁶. Esta investigación también demostró que el potencial desinfectante es dependiente de la **concentración de alcohol, el tipo de alcohol, la cantidad utilizada y el tiempo de contacto 'mano-sanitizante'**; siendo la concentración etanólica la más crítica a la hora de monitorear la calidad tanto de los productores

emergentes como ya establecidos en la época pre-*CoViD*. Un estudio de los sanitizantes de manos comunes en Italia, corroboró que solamente 10 de 18 fabricantes reportaban el contenido alcohólico¹⁸, de los cuales solamente dos estaban en el ámbito requerido de etanol e isopropanol propuesto por la OMS. Por otro lado, la falta de monitoreo alrededor del tema ha llevado a intoxicaciones, casos de ceguera e incluso muertes en países como Estados Unidos por la adición de metanol en los desinfectantes de manos^{20 21}. Para el correcto manejo de la pandemia y para velar por la seguridad sanitaria, es preciso establecer una reglamentación junto con una normativa técnica que asegure la calidad de las mediciones y de los productos utilizados.

Como se mencionó anteriormente, al inicio de la pandemia del 2020 no existía un reglamento ni una normativa técnica en Costa Rica que exigiera el cumplimiento de las formulaciones viricidas a base de alcohol, lo que comprometía la salud pública. Para solventar este problema, se formó un comité técnico nacional, según lo estipulado en el artículo N°20 y N°21 del Reglamento del Órgano de Reglamentación Técnica, compuesto por Instituciones Públicas, colegios profesionales y el sector industrial; para desarrollar y, posteriormente, implementar metodologías orientadas a la mejora de las mediciones analíticas realizadas a estos productos sanitizantes²². La normalización es una estrategia que establece requisitos, procedimientos y características para asegurar que los productos, servicios y sistemas sean seguros; así mejorar el rendimiento y competitividad. No obstante, pese a la creación de las normas y reglamentos nacionales, no existe actualmente un patrón nacional en el campo de la química analítica que permita asegurar y brindar confianza a las mediciones realizadas a este tipo de productos. Lo anterior genera una ruptura de los eslabones de la calidad nacional, ya que al no haber un patrón (cómo MRC) no se puede establecer la veracidad de las mediciones realizadas a este tipo de productos, tampoco se puede asegurar su incertidumbre y, por consiguiente, la confianza de las propiedades químicas de tales productos no puede ser garantizadas y demostradas para ser comercializados de manera justa. Para solventar este vacío, se requiere de un material de referencia que sea certificado de forma metrológica en una o varias propiedades cuantificables y con características definidas tales como su trazabilidad metrológica y su incertidumbre asociada a la medición, la estabilidad y la homogeneidad²³. En Costa Rica se tienen precedentes que inician en el 2002 con el primer material de referencia certificado desarrollado en el país, el cual se utilizó para la calibración de espectrofotómetros de absorción molecular visible-UV, que brindó trazabilidad a las mediciones realizadas con este equipo²⁴. Similarmente, se desarrolló un material de referencia certificado para determinación elemental cuantitativa de Ca y Zn en leche en polvo²⁵, con la finalidad de realizar una ronda interlaboratorial y determinar puntos técnicos de mejora en el sector alimentario. En el 2013 se desarrollaron e implementaron metodologías para el estudio de la homogeneidad y estabilidad de MR de Pb, Cd y Cr; que serían parte de ensayos de aptitud en diferentes laboratorios²⁶. Estos trabajos dejan precedente que el desarrollo y estudio de MR y MRC están orientado a la mejora de las mediciones y, en consecuencia, de la competitividad y confianza de los laboratorios nacionales.

El desarrollo de un material de referencia de alcohol en gel certificado en su valor de pH y contenido etanólico del presente estudio, permitirá a los consumidores tener confianza que los productos que adquieren cumplen con lo estipulado en el reglamento técnico, a través de mediciones analíticas y personal técnico de calidad. Esto se sumará a los esfuerzos país para la contención y avance de la enfermedad del *CoViD-19* en el periodo pandémico y post-pandémico; además de garantizar que el pH sea adecuado para una respuesta dérmica positiva.

1.3. Metrología y Materiales de Referencia

Generalidades de la Metrología

La metrología se conoce como la ciencia que tiene por objeto el estudio de los sistemas de medida²⁷. Esta incluye los aspectos teóricos y prácticos de las mediciones, con su incertidumbre de medida y campo de aplicación. Desde tiempos muy antiguos, el ser humano ha realizado mediciones para su beneficio, ya sea para la construcción de carreteras o intercambios comerciales, por ejemplo. Se ha mencionado que es una de las ciencias más antiguas con la que el ser humano ha tratado²⁸. Su importancia fundamental recae en que en todas las acciones que se realizan para comprender propiedades físicas y químicas de los objetos y los fenómenos que nos rodean se hacen a partir de mediciones y por lo tanto, estas deben ser confiables y adaptarse a las nuevas necesidades que surjan del desarrollo humano. La metrología está presente en intercambios comerciales, en sector industriales e incluso el campo jurídico. Es un hecho que el avance científico está ligado a la capacidad que tenemos de medir.

Se conocen oficialmente tres grandes ramas de división de la metrología:

- Metrología industrial: rama de la metrología que se relaciona con el uso de equipo o instrumentación que genera mediciones asociadas al control de procesos tecnológicos, ejemplo de esto es el uso de manómetros y termómetros usados en un proceso de extrusión de plástico, por ejemplo. Básicamente se extiende a calibraciones, controles y mantenimientos de todo equipo de medición en actividades vinculadas con procesos de prestación de servicios, donde estas mediciones están directamente relacionadas a la calidad de un producto final. Es por esto, que las mediciones deben asegurar su calidad puesto que muchas decisiones de una industria (y el costo que significa) sobre sus procesos y productos dependen de los resultados obtenidos²⁹.
- Metrología legal: es la rama encargada de proteger al consumidor para garantizar que el fabricante de cierto producto cumple con los requerimientos técnicos y jurídicos reglamentados. Le provee al ciudadano confianza en el uso de los instrumentos relacionados con transacciones comerciales, de salud y medio ambiente³⁰.
- Metrología científica: es la rama encargada del desarrollo de patrones primarios de medición, tanto su establecimiento como custodia, para definir las unidades de base y derivadas del Sistema Internacional de Unidades (SI)³¹.

La Metrología basa sus directrices en la Convención del Metro²⁷. Esta Convención crea al *BIPM* (Buró Internacional de Pesos y Medidas), bajo la autoridad de la *CGPM* (Conferencia Internacional de Pesos y Medidas) y la supervisión del *CIPM* (Comité Internacional de Pesos y Medidas)²⁷. El *BIPM* emite las políticas que aplican de forma global sobre metrología y se enfoca en investigaciones de patrones de medición. El *CGPM* tiene a su cargo discutir y examinar el trabajo realizado por diferentes Institutos de Metrología y el *BIPM*, emite recomendaciones en materia de metrología, pero más específicamente, sobre el Sistema Internacional de Unidades. Finalmente, el *CIPM* es un comité encargado de discutir el trabajo de la *BIPM* y su situación financiero-administrativa entre los miembros de la Convención del Metro. Además, discute el trabajo metrológico que los estados miembros decidan realizar en conjunto³².

Hoy en día y desde 1960 en la 11^{va} Conferencia Internacional de Pesos y Medidas, el Sistema Internacional de Unidades es el sistema aceptado para la definición de las magnitudes físicas fundamentales, las cuales son: segundo, metro, kilogramo, amperio, kelvin, mol y candela. Las unidades del SI constituyen una referencia internacional para los instrumentos de medición y aseguran que

independientemente de dónde se mida y se calibre, se puede asegurar el cumplimiento de las características definidas³¹.

Patrones y Materiales de Referencia.

Según el VIM, un patrón se define como: **"medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad, o uno o varios valores de una magnitud para servir de referencia"**³³. Existen diferentes tipos de patrones, ya que el patrón primario nace como una manera que representar una unidad fundamental y para obtener comparativas de este con los diferentes sistemas de medición, se requiere el uso de patrones secundarios (y así sucesivamente), que permitan una correcta trazabilidad metrológica al patrón primario, pero sin tener la necesidad de compararlo directamente con él. Una representación gráfica de esta jerarquía se observa en la *Figura 1*.

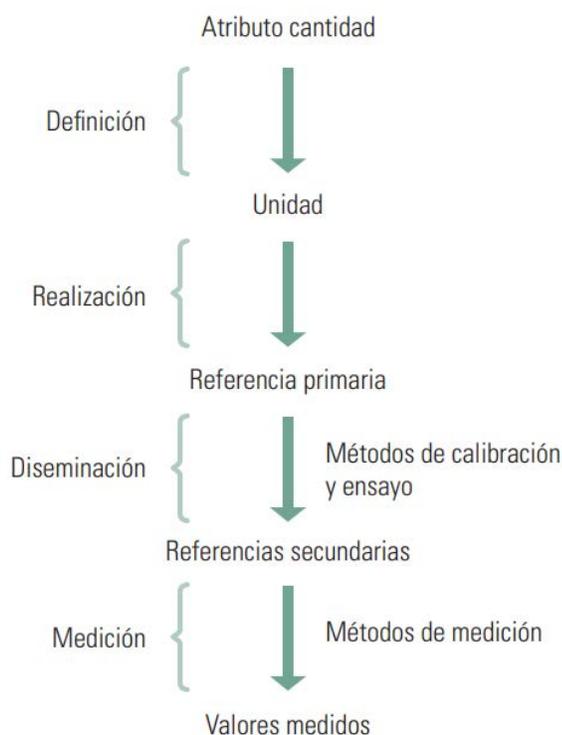


Figura 1: Relación lógica entre conceptos de metrología para usarse en estandarización de mediciones. Tomado de Escamilla, A (2014)³⁴.

Por esta razón, se define el patrón primario como: un patrón que es designado o ampliamente reconocido que presenta las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor es establecido sin referirse a otros patrones de la misma magnitud. Y patrón secundario como: los estándares cuyos valores se asignan por comparación con un patrón primario de la misma cantidad, usado cuando resulta impráctico utilizar el patrón primario directamente³⁵. Los materiales de referencia certificados (MRC) son un tipo de patrón y se definen **como**: "un material que posee una o varias propiedades físicas y/o químicas definidas y certificadas por procedimientos que establecen su trazabilidad a la obtención exacta de la unidad en la cual los valores de la propiedad que son expresados, con cada valor certificado se acompaña una incertidumbre de medida"³⁵. Estos MRC se emiten con un certificado con sus valores y su incertidumbre de medida asociada. La certificación de un material se basa en 4 guías de la ISO: 30, 31, 33 y 35; además de la norma ISO

17034. En estas guías estandarizadas se definen conceptos y describen las etapas que debe tener el material para ser considerado MRC, las cuales son:

1. Producción del Candidato a Material de Referencia (CMR).
2. Caracterización del material: involucra la definición del MR, la matriz, las propiedades a certificar y su nivel de incertidumbre de medida requerida. Debe tener definido el muestreo, preparación de muestra y el método (o métodos) de certificación.
3. Evaluación de su homogeneidad entre y dentro unidades, esta última si el material, por su naturaleza, así lo requiere.
4. Evaluación de su estabilidad, que debe tener las condiciones de transporte y almacenaje recomendados para el material. Debe incluir también la incertidumbre combinada considerando la estabilidad, así como las otras dos etapas anteriormente mencionadas³⁶.

Organismos metroológicos oficiales, ya sea locales o internacionales, son los encargados de producir y certificar el material de referencia, para ser distribuidos posteriormente y utilizados según el fin provisto.

La utilidad de los materiales de referencia y materiales de referencia certificados es muy variada, pero todas poseen el fin último de garantizar la calidad de las mediciones que se realicen. A nivel de control interno, se pueden emplear en la calibración de un sistema de medida, la evaluación de un procedimiento de medida, asignación de valores a otros materiales, validación de metodologías (brinda exactitud a las mediciones y trazabilidad) y control de calidad. A nivel externo, se utilizan para pruebas interlaboratorio, dirigidos en nuestro país por el Laboratorio Costarricense de Metrología (LCM)³⁷.

Trazabilidad Metroológica

Según el VIM, el concepto de trazabilidad metroológica se define como: **“la propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida”**³³. Esta propiedad está directamente relacionada al resultado final y no al instrumento como tal, es decir: el resultado obtenido con su incertidumbre de medida asociada se presenta mediante un método válido que posee una sucesión de patrones y calibraciones que relacionan el resultado de medición con una referencia aceptada y trazable metroológicamente a un ente máximo (como podría ser el SI) o un laboratorio de calibración acreditado. Los elementos necesarios para confirmar la trazabilidad metroológica son: una cadena de trazabilidad ininterrumpida a un patrón internacional o a un patrón nacional, una incertidumbre de medida documentada, un procedimiento de medida documentado, una competencia técnica reconocida, trazabilidad metroológica al SI y los intervalos de calibraciones³³. La trazabilidad asegura la confiabilidad de los resultados, como también la comparación con una referencia oficial reconocida por un ente apropiado. Además, al tener resultados de diferentes laboratorios provenientes de sistemas confiables, de una misma muestra, podemos asegurar la comparabilidad de los resultados al poseer trazabilidad metroológica adecuada²⁶.

Incertidumbre de medida, homogeneidad y estabilidad en MRCs.

Cualquier método analítico utilizado para conocer el mensurando es insuficiente en la obtención del valor y su confiabilidad si no se ha tomado en cuenta la incertidumbre de medida asociada a ese resultado, que se compone de las fuentes de error aleatorio y sistemático que puedan tener los pasos y equipos utilizados para expresar un valor. La incertidumbre de medida según el VIM, se define como: **“un parámetro (no negativo) que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mensurando”**³³. El principio, el método y el procedimiento de medición son aspectos de

alta importancia para el cálculo de la incertidumbre, por lo que el desconocimiento de estos conduce inevitablemente a una estimación errada o incompleta de la incertidumbre de la medición. Es reconocido que la incertidumbre de medida asociada al resultado habla de la calidad del resultado como tal. Se considera importante conocer las fuentes de incertidumbre una vez que se conoce el principio, el método y el procedimiento de medición. Estas provienen de factores involucrados en la medición, como podrían ser:

- Resultados de la calibración del instrumento.
- Incertidumbre del patrón o MR.
- Repetibilidad
- Reproducibilidad.
- Resolución, deriva, histéresis: u otras características propias del instrumento.
- Condiciones ambientales y su variación.
- Modelo de medición
- Variaciones en las magnitudes de influencia³⁸.

Se han determinado dos tipos de métodos para la determinación de la incertidumbre de medida: Tipo A y Tipo B. El Tipo A se define como el método de evaluación mediante análisis estadísticos de series repetidas de observaciones. Mientras que el Tipo B se refiere a métodos ajenos al análisis estadístico de series de observaciones³⁹.

Según la ley de propagación de la incertidumbre, cada magnitud que aporte al resultado final debe considerarse para la estimación final de incertidumbre. De esta manera, de forma conveniente, diagramas de Ishikawa pueden esbozarse en función del modelo matemático que relacione a dichas magnitudes para obtener la magnitud final de interés, donde cada entrada a la línea principal corresponde una fuente que debe entrar considerarse para el cálculo de incertidumbre asociado. Estas entradas serán estudiadas según su origen, ya sea que se puedan evaluar por distribución estadística de una serie de mediciones y caracterizados por las desviaciones estándar (tipo A) o bien, utilizando criterios que no provienen de repeticiones sino de otras distribuciones de probabilidad como triangulares, rectangulares o Gaussianas (normales) provenientes de otros criterios científicos válidos (tipo B)³⁹.

La incertidumbre estándar combinada será entonces, una expresión que considera cada aporte de la incertidumbre independiente y así cuantifica el ámbito donde el valor calculado oscilará, con cierto grado de confianza. Matemáticamente, será estimada como la raíz cuadrada positiva de la variación total obtenida **al combinar "N" aportes independientes "i"**:

$$\mu_c^2 = \sum_{i=1}^N \mu_i^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo, μ_c la incertidumbre combinada y μ_i los aportes de incertidumbre independientes.

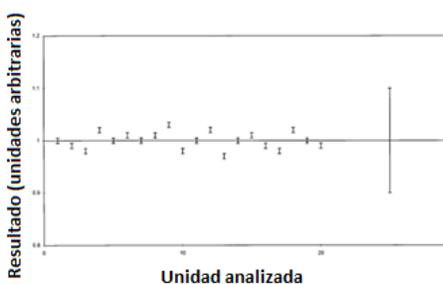
En la práctica, se necesita conocer el intervalo donde es razonable suponer, con alta confiabilidad estadística, que se encuentran los infinitos valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mensurando. La μ_c obtenida de la expresión anterior aún presenta una probabilidad baja de comprender el intervalo (bajo el supuesto de que el mensurando se encuentre bajo una distribución normal, la probabilidad es apenas del 68%)⁴⁰, **por lo que se debe considerar un factor de cobertura "k", valor que multiplica a μ_c y expande el ámbito de valores asignables al mensurando, bajo un cierto porcentaje de probabilidad. Esta incertidumbre, conocida como incertidumbre expandida, se expresa, para un mensurando "y" de la siguiente manera:**

$$U_p = k_p \cdot \mu_c(y)$$

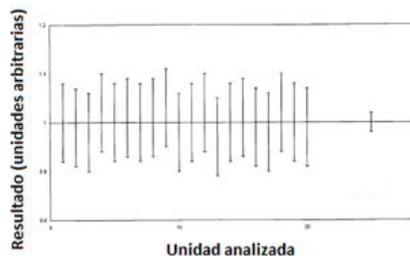
Ecuación 2

Donde U corresponde a la incertidumbre expandida; p, el grado de confianza porcentual; k, el factor de cobertura y μ_c la incertidumbre combinada.

Los materiales de referencia deben considerar adicionalmente el aporte de la incertidumbre asociada a la homogeneidad del lote, que será distribuido en diferentes unidades empacadas, para un fin determinado; y la incertidumbre asociada a la estabilidad del material a lo largo de corto, medio y largos periodos de tiempo de transporte, reposo y almacenaje en condiciones específicas. La homogeneidad es una característica crucial en los materiales de referencia, la misma se debe determinar mediante la cuantificación de la variabilidad entre unidades a partir de un muestreo representativo del lote, así como en mediciones dentro de unidades (si aplica). Esto es de especial relevancia si el MR no es de único uso, sino que puede ser utilizado en repetidas ocasiones. Es deseable que el aporte de la incertidumbre por homogeneidad no sea superior al asociado a la caracterización, demostrando que el analito está distribuido de forma uniforme en todo el lote fabricado, y que cualquier unidad recibida para un fin determinado es apropiada para su uso. Considerando que uno de los usos más comunes de los MR corresponde al estudio interlaboratorial, la homogeneidad no puede ser un supuesto, sino que debe estar calculada y considerada dentro de la certificación del material, ya que un material heterogéneo sesgaría cualquier réplica de resultados y posterior análisis estadístico y evaluativo de rendimiento analítico. Como se puede observar en las *Figura 2.A y 2.B*, se tiene un ejemplo de un estudio de homogeneidad entre unidades, donde se debe analizar más allá de su significancia estadística sino como significancia práctica. Es decir, en la *Figura 2.A* se reporta heterogeneidad entre muestras ($F_{exp} > F_{0.05}$) pero despreciable al compararla con la incertidumbre aportada de caracterización, por lo que no se considera un factor de alta relevancia para la propagación de la incertidumbre, aunque sí podría ser un ser indicador a considerar para el proceso productivo y de proceso del MR. Por otro lado, en la *Figura 2.B*, se puede observar que estadísticamente el material se considera homogéneo ($F_{exp} < F_{0.05}$), no obstante, el aporte de la incertidumbre por homogeneidad supera al valor de la incertidumbre por caracterización, lo que indica un alto nivel de alerta y que debe ser analizado para ubicar la fuente de variabilidad que explica esa diferencia.⁴¹



A.



B.

Figura 2 A y B: Ejemplo de estudios de homogeneidad entre unidades y comparadas con el aporte de incertidumbre por caracterización. Tomado de Pauwels, J. (2001)⁴². El último dato observado a la derecha en ambas figuras, representa la incertidumbre por caracterización.

La incertidumbre de medida asociada a la homogeneidad debe obtenerse a partir de un número repetido de mediciones (incertidumbre tipo A), de manera que se pueda establecer un ANOVA para la obtención de la varianza entre botellas. Para obtener la incertidumbre combinada de homogeneidad entre

unidades, se debe contemplar tanto esta varianza entre unidades como la varianza del método como tal, de manera que la expresión general sería la mostrada a continuación.

$$\mu_{homo}^2 = s_{bb}^2 + s_{meas}^2 \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo s_{meas} el cociente de la variabilidad intrínseca del método dividido por la raíz cuadrada de "n" réplicas por unidad y s_{bb} la incertidumbre entre las unidades.

Este acercamiento puede ser utilizado de igual manera para el cálculo de variabilidad dentro de las unidades. La conclusión final, si se determina un aporte significativo de incertidumbre por heterogeneidad, es que cada unidad debería ser certificada de forma independiente, además de identificar las condiciones y parámetros de la manufactura que podrían mejorar la homogeneidad del CMR.⁴¹

Los estudios de estabilidad son importantes para definir condiciones óptimas de almacenamiento, asimismo para definir una fecha de expiración donde la certificación del material muestra degradación y por lo tanto no se puede tomar como referencia el dato certificado inicialmente. Los materiales pueden sufrir degradación ya sea por temperatura, interacción con el recipiente, presencia de oxígeno, actividad microbiana y humedad; para mencionar los más comunes. Si el material debe ser transportado largas distancias y en condiciones no controladas, debe considerarse también este aporte dentro de los estudios de estabilidad. Para efectos del material en cuestión, este dato puede no ser considerado.⁴²

Dos tipos de estudio o metodologías típicas se utilizan para determinar la estabilidad de un MR: el clásico y el isócrono. El primero consiste en almacenar, bajo condiciones especificadas previamente, una cantidad de unidades que son analizadas de forma periódica en el tiempo. Este proceso debe considerar la reproducibilidad del método, ya que se planifica en largos periodos de tiempo, y esta consideración no es menor, ya que puede ser una fuente de alta variabilidad (un ejemplo de un esquema de estudio clásico se observa en la *Figura 3*)⁴³. Por otro lado, el segundo tipo de estudio corresponde al isócrono, el cual se basa en definir condiciones de almacenamiento (en términos de humedad relativa y temperatura), introducir todas las unidades en un tiempo cero e ir retirando unidades periódicamente, para almacenarlas en una temperatura de referencia donde no asume que no habrá problemas de estabilidad. Al final del tiempo estudio, se retiran las últimas unidades y se procede a medir todas en condiciones de repetibilidad. Ambos ensayos presentan ventajas y desventajas, ya que, si bien el isócrono minimiza el efecto de la reproducibilidad, no permite saber el rendimiento de estabilidad del material hasta finalizado el ensayo, a diferencia del clásico que monitorea periódicamente el estado del material de referencia. Ambos pueden ser utilizados para estudios a largo y corto plazo, es decir, que evalúen las condiciones de almacenamiento y transporte del material, respectivamente.⁴⁴

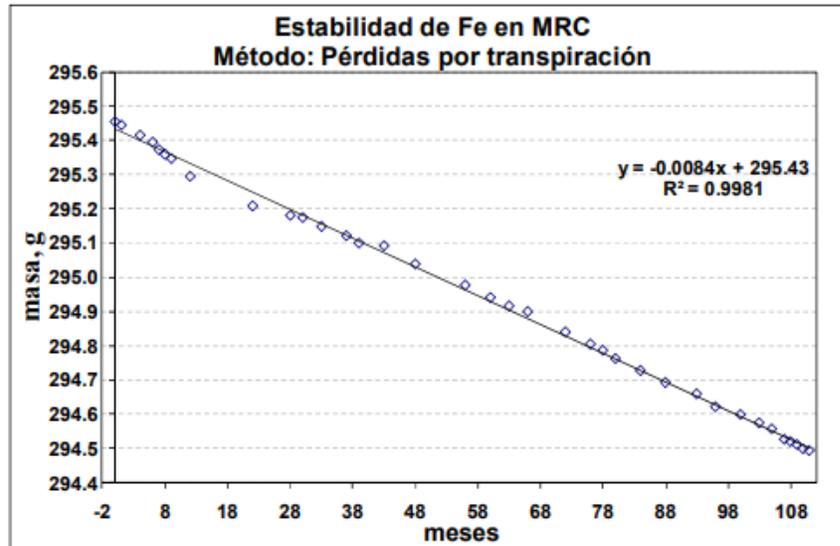


Figura 3: Ejemplo de un estudio clásico de estabilidad, donde se observa la tendencia decreciente en masa de estabilidad en un material certificado en concentración de hierro a lo largo del tiempo. Tomado de: Arvizu, M. (2010)⁴³.

Para un material de referencia certificado, se considera generalmente para el cálculo de la incertidumbre combinada, el aporte de la incertidumbre de caracterización, es decir al proceso metodológico para la obtención del valor asignable al MRC; la incertidumbre de homogeneidad y el valor de incertidumbre de estabilidad y se expresa según la Ecuación 4:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{carac}^2 + u_{hom}^2 + u_{estab}^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Finalmente, se realiza la expansión de la incertidumbre mediante un coeficiente $k=2$, de manera que se obtiene una expresión final de incertidumbre expandida para el MRC al 95 % de confianza.

Validación de Metodologías

La validación de metodologías se define, según la norma ISO/IEC 17025, como la confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto⁴⁵. Es decir, definir un requisito analítico y confirmar, a través de diversos parámetros de desempeño, que brinda resultados con respaldo estadístico y metrológico apropiado. Este proceso es relevante ya que los parámetros de desempeño determinan en cuales condiciones de la matriz, analito y equipo deben ser consideradas para garantizar la mayor exactitud en los resultados; en términos de ámbitos de trabajo, robustez de cuantificación ante posibles interferentes de la matriz, sensibilidad del equipo hacia el analito, los límites de detección y cuantificación del analito (concentración mínima a ser detectada y cuantificada con adecuada calidad estadística), la precisión entre distintas mediciones y veracidad (caracterizada como sesgo) contra un material de referencia certificado. De acuerdo con los resultados obtenidos de una validación, el método posee un respaldo teórico/práctico que garantiza la calidad de los resultados obtenidos.

1.4. Fundamento teórico de los métodos de análisis cuantitativo

La química analítica cuantitativa se basa en la determinación numérica de la concentración en uno o varios analitos específicos a través de técnicas clásicas o instrumentales, debidamente validadas y trazables. **Este tipo de análisis se basa en "cuánto hay"**.

Para efectos de los datos obtenidos y tratados en este trabajo, se enfocará la explicación en el análisis químico cuantitativo, ya que el Material de Referencia debe tener los datos certificados y calculados de etanol y pH de forma exacta y precisa, para someterse a pruebas de intercomparación, ser usado en procesos de validación, verificación y aseguramiento general de la calidad de las mediciones y métodos. A continuación, se hará una descripción del fundamento teórico de los métodos de análisis utilizados en este trabajo ya que entender el funcionamiento a nivel molecular, atómico y/o fisicoquímico, nos permite tener certeza de los resultados obtenidos.

Cromatografía

La cromatografía es una técnica analítica que se basa en la separación de los diferentes componentes de una mezcla compleja, mediante interacciones los analitos (desplazados por una fase móvil), con una fase estacionaria de propiedades físicas y químicas definidas. La cromatografía de columna es un tipo de cromatografía que se basa en el movimiento e interacción de la mezcla (por acción de una fase móvil líquida o gaseosa, que se mueve por presión o gravedad) a través de una columna (o tubo) que contiene una fase estacionaria. Se puede establecer un equilibrio químico del analito en fase estacionaria y en fase móvil, con su constante de equilibrio asociada llamada K_c (constante de distribución).

$$A(\text{en fase móvil}) \leftrightarrow A(\text{en fase estacionaria})$$

$$K_c = \frac{C_s}{C_m}$$

Donde A corresponde al analito, C_s a la concentración molar del analito en fase estacionaria y C_m la concentración molar del analito en fase móvil. El valor de K_c puede aumentar o disminuir en función de las interacciones químicas y/o físicas favorables entre analito y fase estacionaria, ya sea por polaridad (fuerzas no covalentes), interacciones iónicas, tamaño del poro; entre otras.

Cromatografía de Gases

La cromatografía gas-líquido o solamente cromatografía de gases, es un tipo de cromatografía de columna que se utiliza para la separación de componentes de una mezcla volátil. Una muestra líquida (lo más común, ya que existen otros tipos de inyección como por ejemplo *Head-Space* que consiste en la entrada de la fase gaseosa directamente) ingresa al equipo con una jeringa calibrada por un puerto de inyección, que evapora la muestra por su alta temperatura, a 50 °C por encima del componente menos volátil, y es arrastrada por un gas inerte hacia una columna de separación con fase estacionaria líquida anclada de estructura química definida. Al eluir por la columna con una presión y temperatura definidas, los analitos separados de la mezcla inicial entran a un detector que envía una señal y genera un cromatograma, que corresponde a un gráfico de señal en función del tiempo. A través de la confección de una curva de calibración en un ámbito de trabajo apropiado, se permite traducir la señal del equipo a una concentración final para el analito. Las diferentes partes críticas del equipo se explican a continuación.

Fase Móvil

En la cromatografía de gases, la fase móvil corresponde a un gas que sea inerte a los analitos, a la fase estacionaria y al detector acoplado; por lo que se utiliza comúnmente helio, nitrógeno o argón (elegido por la naturaleza del detector utilizado). La presión en la columna y la velocidad de flujo se regulan con válvulas y manómetros que deben mantenerse constantes en todo el análisis, ya que la velocidad de flujo por la columna sí afectará el cromatograma obtenido, según la función de Van Deemter que considera las propiedades físicas, cinéticas (de transferencia de masa entre fase estacionaria y móvil) y termodinámicas de una separación.⁴⁶

Columna capilar

La columna de la cromatografía de gases empaca la fase estacionaria. Hay diversos tipos de columnas y todas se encuentran en función de la identidad de los componentes en la mezcla a eluir. Grandes avances se han desarrollado en las columnas y fases estacionarias en el pasado cercano y se sigue investigando fuertemente para mejores rendimientos y extensiones de vida útil, puesto que esta sección de la cromatografía de gases se considera el cerebro de la técnica⁴⁷.

Las más utilizadas corresponden a las columnas capilares con fase estacionaria líquida, la cual recubre las paredes internas de la columna con una capa delgada. Este tubo presenta apertura en uno de sus extremos por lo que se conoce como “tubular abierta”. La estructura básica se muestra en la *Figura 4*, donde su recubrimiento de poliimida le brinda un refuerzo por ser más delgada que una de vidrio o acero inoxidable, siendo más resistentes tanto física como químicamente (es decir, más inertes)⁴⁸.

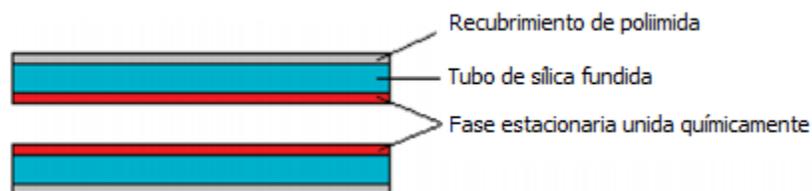


Figura 4: Columna de sílice fundida mostrando su recubrimiento de poliimida, el tubo de sílice fundida y su fase estacionaria la cual se encuentra unida por quimisorción. Tomado de: Rahman, M. (2015)⁴³.

Fase Estacionaria

Por si sola la columna capilar no podría realizar ningún tipo de separación, es el recubrimiento anclado a la columna que posee capacidades de separación entre analitos de una mezcla, según el coeficiente de partición. La retención está en función de la interacción no covalente que haya entre componentes de la mezcla y la fase estacionaria, la cual no debe ser demasiado favorable que produzca elución muy lenta ni muy poco afín que por lo contrario sea corta con mala separación de analitos. Algunas condiciones de las fases estacionarias que se deben cumplir para su estabilidad y buen funcionamiento son: baja volatilidad, es decir que su vaporización se encuentre al menos 100 °C por encima de la temperatura máxima de uso de la columna; estabilidad térmica, químicamente inerte, o bien que las interacciones con componentes de una mezcla no cambien su identidad química; y adecuados factores de retención y factores **de selectividad (respectivamente κ y α)** para la separación de la mezcla en tiempos razonables, es decir que tenga características de disolvente⁴⁹.

Las fases estacionarias más comunes actualmente corresponden a los polisiloxanos como se observa en la Figura 5A. Este tipo de polímero cumple con las características deseables de fase estacionaria al tiempo que la modificación de los grupos -R laterales en diferentes proporciones para separaciones de analitos más específicos. Una fase estacionaria común corresponde al polietilenglicol

(Figura 5B), misma que presenta alta polaridad y está destinada a compuestos con grupos -OH, glicoles, éteres y ácidos libres. Es de alta importancia conocer la identidad de los analitos con el fin de elegir la fase estacionaria adecuada y evitar corridas cromatográficas largas⁴⁸.

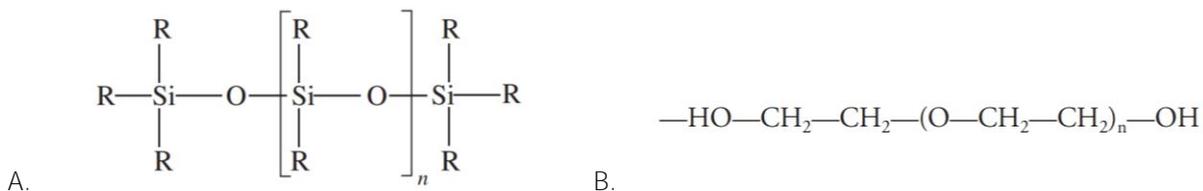
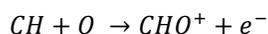


Figura 5: Estructura base de una fase estacionaria de polisioxanos (A) y polietilenglicol (B).

Detectores

Una vez que los diferentes analitos son separados por la elución a través de la fase estacionaria, llegan al final de la columna e ingresan al detector. La cromatografía como tal es un método meramente separativo y requiere de un detector acoplado para relacionar la señal obtenido a la cantidad de analitos presente. Al igual que sucede con la fase estacionaria, la elección del detector está determinada en gran parte por la identidad de los analitos esperados. Los detectores deben tener las siguientes características: sensibilidad, linealidad en la cantidad de muestra que pasa por ellos con la señal mostrada para cierto grado de magnitud; estabilidad, reproducibilidad, tiempo rápido de respuesta sin considerar la cantidad el caudal que pase a través y por último, fiabilidad y manejo sencillo⁵⁰. El detector por ionización de llama es de los más utilizados en el mercado actual por su facilidad y capacidad de detección de una amplia gama de compuestos orgánicos⁵¹. Se determinó que los compuestos orgánicos que pasan por la llama a altas temperaturas sufren una descomposición química denominada pirólisis, que genera iones gaseosos **detectados por un electrodo ("colector"**, según la Figura 6) de alta sensibilidad⁵². Esta señal detectada puede correlacionarse con la cantidad de analito presente en la inyección y por lo tanto, en la muestra. A como se muestra en la Figura 6, el gas de arrastre a la salida de la columna se une con un flujo de hidrógeno y aire de alta pureza, lo que genera una llama de alta temperatura que provoca la pirólisis de los grupos C-H presentes, según la reacción básica demostrativa mostrada a continuación:



El detector *FID* no logra detectar, por lo tanto, grupos que no formen iones u electrones en su pirólisis, como el caso de grupos como -OH, -C=O, H₂S, -NH₂, CO₂ y similares; al igual que en la mayoría de gases de arrastre⁵².

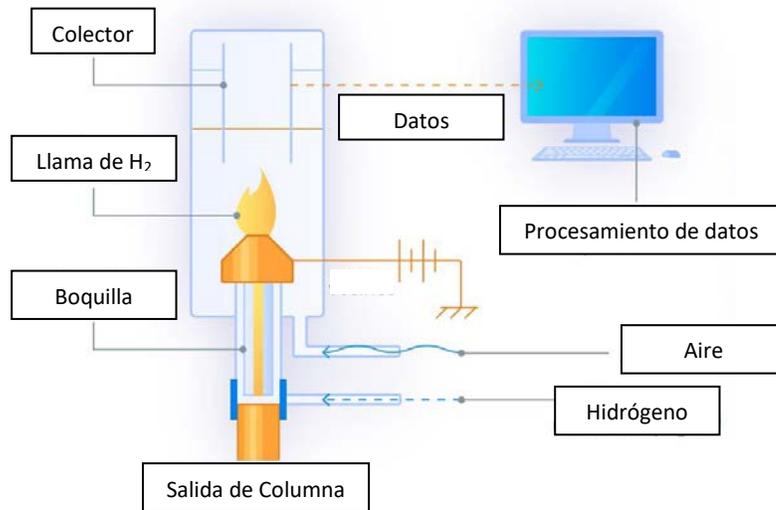


Figura 6: Esquema de un equipo de ionización por llama (FID). Tomado de Shimadzu (2020)⁵².

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja es una técnica que se basa en la interacción de la radiación electromagnética emitida entre las longitudes de onda de (650 a 4000) nm, con los enlaces químicos de una molécula estudio. Esta radiación es absorbida por la molécula, generando diferentes modos vibracionales que son interpretados y graficados en un espectro infrarrojo, el cual proporciona información para caracterizar grupos funcionales al presentar picos en regiones específicas del espectro IR. El funcionamiento de un equipo de espectroscopía infrarroja se basa en el interferómetro de Michaelson, que se describe en la Figura 7 a continuación.

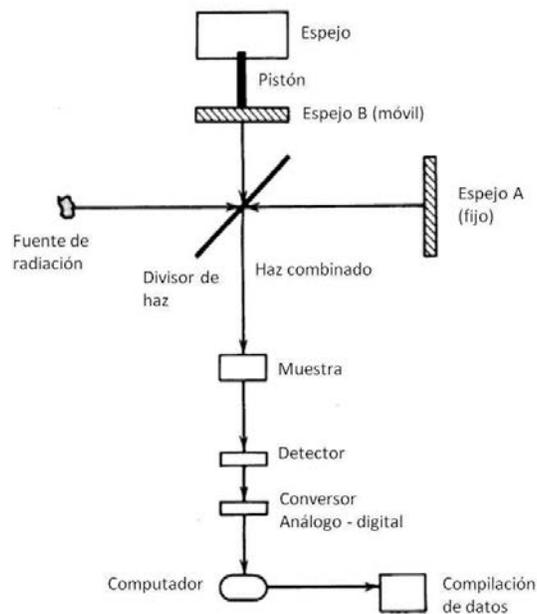


Figura 7: Esquema de un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier. Tomado de Torres, M. (2010)⁵¹.

A partir del diagrama anterior, el funcionamiento de un equipo Infrarrojo por Transformada de Fourier consiste en la emisión de radiación de forma constante por una fuente, la cual encuentra un espejo divisor inclinado 45° con respecto al rayo, que lo separa en dos: uno de ellos se refleja y se desplaza hacia un espejo estacionario (espejo A), donde se vuelve a reflejar, pasa por el espejo divisor y seguidamente hacia el detector. El otro rayo, atraviesa el espejo divisor, se refleja en un espejo móvil que se desplaza hacia delante y hacia atrás; para luego regresar al espejo divisor, reflejarse hacia el detector, donde ambos rayos se encuentran de forma colineal y sus frentes de onda generan un patrón de interferencia (patrón de claros y oscuros). Este patrón va cambiando en forma y en intensidad en función del movimiento del espejo móvil, donde el patrón de claros y oscuros llega al detector y se interpreta como una función sinusoidal. Esta función, dependiente del tiempo, utiliza la Transformada de Fourier para convertir los datos a ser dependientes de la frecuencia; es decir; se toman señales de amplitud dependientes del tiempo y las convierte en energía en el dominio de frecuencia. Esta información genera las señales del espectro IR. Una vez que se obtiene el interferograma para el equipo sin muestra, se procede a colocar la muestra en el punto donde los dos haces de luz se unen. En este punto, el compuesto absorbe una cantidad de energía en función de los grupos funcionales y modos vibracionales que posea, cantidad de energía determinada por diferencia entre el espectro de referencia (sin muestra) y el espectro nuevo obtenido. Esta cantidad de energía, a diferentes longitudes de onda, se grafica y se obtiene el espectro IR del compuesto de interés.⁴⁹

53

Estos espectros infrarrojos se grafican como absorbancia o transmitancia contra longitud de onda, lo que permite determinar absorbancias crecientes en ciertos picos, según aumenta la concentración del analito; de esta manera con este equipo, se permite la cuantificación de un analito de interés.

A nivel molecular, las moléculas pueden tener diferentes tipos de interacción con la energía que se irradia. Los enlaces químicos pueden sufrir estiramientos simétricos o asimétricos, flexiones de tijera, flexiones de balancín, flexión por aleteo o flexión por torsión. Todos estos movimientos cambian a partir de la naturaleza de los enlaces químicos y de la longitud de onda con la que se irradia la muestra, por lo que las señales en el espectro varían según los modos vibracionales presentes. De esta manera, un mismo enlace entre dos átomos puede mostrar dos o más señales, puesto que los movimientos a nivel molecular serán diferentes⁴⁹.

Densimetría de Oscilación Armónica

La densidad, es decir la masa de un cuerpo que ocupa un determinado volumen, es una magnitud que es de provecho para caracterizar compuestos, considerando que la densidad de un compuesto puro a cierta temperatura siempre será la misma y diferente a cualquier otra. De no cumplirse esto, se puede pensar en que la pureza de la sustancia en estudio se pudo ver comprometida. La densidad de mezclas binarias como etanol-agua, se ha determinado mediante tablas oficiales, que indican cuánta cantidad de etanol puede tener una matriz acuosa a cierta temperatura, en concentración en volumen expresada como porcentaje⁵⁴. Hay diferentes tipos de densímetros:

- Pícnómetros: recipientes, generalmente de vidrio, que poseen un volumen calibrado y definido de (25.00 o 50.00) mL. Al añadir la sustancia, esta queda abarcando totalmente el contenido del recipiente y su masa puede ser determinada. Al obtener una masa de la sustancia en un volumen definido, se puede calcular su densidad según el cociente de estos valores. Es un método exacto y preciso siempre y cuando se tenga los cuidados del caso, como puede ser no llenar de grasa las paredes, limpiar bien el desborde de sustancia y controlar bien las variaciones de temperatura⁵⁵.

- Areómetro: consiste en un cilindro de vidrio hueco que posee un bulbo pesado en la sección inferior que lo hace flotar verticalmente. Se introduce en el líquido y se deja flotar libremente hasta estabilidad, sin chocar con los bordes del recipiente. El vástago tendrá una graduación fija que indicará la densidad del líquido en el cual está inmerso⁵⁶.
- Densímetro con balanza: es un sistema que posee un recipiente que contiene la muestra en aire, donde determina su masa. Seguidamente la muestra se sumerge en un líquido que puede ser agua o etanol y se determina la diferencia de peso obtenido. Esta diferencia, junto con el volumen del cuerpo de vidrio, corresponde a la densidad de la muestra. Este método posee alta exactitud, no obstante, es un método que requiere de diversos insumos y está limitado a especies sólidas.

El densímetro de oscilación armónica es un tipo de densímetro que se caracteriza por medir la densidad de líquidos. Se compone de un tubo en forma de U de vidrio borosilicato, el cual se estimula para vibrar a una frecuencia característica. Esta frecuencia varía dependiendo de la densidad de la muestra en cuestión⁵⁷. La densidad se calcula a partir de un coeficiente entre la oscilación del tubo en forma de U con la oscilación de referencia, según la ecuación descrita a continuación:

$$\text{Densidad} = KA \cdot Q^2 \cdot f_1 - KB \cdot f_2 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde, KA y KB corresponden a factores del equipo, f_1 y f_2 corresponden a factores de corrección por viscosidad, temperatura y no linealidad. Finalmente, Q corresponde al coeficiente del periodo de oscilación del tubo en U entre el periodo de oscilación de referencia.

Es posible el cálculo de concentración de mezclas binarias de agua-etanol con este equipo, al tener integradas las tablas de relación densidad-concentración (porcentual, en volumen). El equipo posee ajustes por viscosidad y temperatura y es sumamente preciso y exacto al expresar datos con una exactitud de $\pm 0.00001 \frac{g}{cm^3}$ ⁵⁸.

Las ventajas de los densímetros de oscilación armónica contra otros equipos de densidad son:

- Mayor exactitud y precisión.
- Excelente control de temperatura, con 3 decimales de forma digital.
- Resultados rápidos.
- Calibración/verificación con agua destilada, de manera que se pueden garantizar los resultados con alta confiabilidad.
- No hay necesidad de procedimientos manuales que pueden generar errores sistemáticos.
- Poca muestra para obtener los resultados⁵⁹.

Potencial de Hidrógeno

El pH, o potencial de hidrógeno, es un coeficiente adimensional que localiza en una escala el grado de acidez (o basicidad) en una solución, a partir de la concentración o actividad de iones hidrógeno disueltos. Los conceptos para el pH fueron propuestos Arrhenius, Brønsted y Lewis en el siglo XIX. Según Arrhenius, las sustancias ácidas eran las que contenían hidrógeno y cedían iones hidrógeno en solución acuosa; mientras que las bases contenían grupos -OH los cuales cedían como iones hidróxido en solución acuosa. Por otro lado, los científicos Brønsted y Lowry en 1923, introdujeron el concepto que un ácido es un donador de protones (o donador de iones de hidrógeno) y una base es un aceptor de protones; empezando a denominar a las sustancias como par conjugado ácido-base. Similarmente y en el mismo año,

Lewis propuso la teoría ácido-base definiendo al ácido como un aceptor de electrones y a la base como un donador de electrones.⁶⁰ Formalmente, el concepto de pH fue propuesto por Soren Sorenson, matemáticamente como el logaritmo negativo de la actividad de iones hidrógeno en solución:

$$pH = -\log[a_H]$$

Para el caso de soluciones acuosas diluidas, la diferencia entre la actividad de iones H⁺ y la molaridad de éstos puede despreciarse, lo que de forma conveniente se puede expresar como:

$$pH = -\log[H^+]$$

Diversas técnicas se conocen para determinar el pH de una solución, mismas que van desde indicadores coloreados de pH o electrodos de pH convencionales hasta la utilización de RMN. Estas técnicas se pueden clasificar de forma general en métodos ópticos, electroquímicos y gravimétricos; siendo los métodos electroquímicos los más comunes y el de mayor enforque para efectos de la investigación. Esta técnica consiste en la detección electroquímica utilizando electrodos de pH, que detectan cambios de potencial, corriente o impedancia; ya sea mediante potenciometría o voltametría. La potenciometría es el método más común encontrado en laboratorios de la industria e investigación, consiste en la medición de potencial entre un electrodo de pH y uno de referencia en una celda electroquímica que responde a la actividad de un electrolito en solución bajo la condición de cero corriente, siendo denominada (por ésta última cualidad), un método de equilibrio.⁶¹ El electrodo para pH más común corresponde al electrodo de vidrio con membrana permeable, con electrodos de referencia de Ag/AgCl y calomel saturado. Tomando como referencia la Figura 8 adjunta, la electroquímica presente en estos sistemas se explica esencialmente desde el concepto de una celda galvánica, donde la interacción en superficie del electrodo de vidrio por los iones H⁺ provoca una fuerza electromotriz con respecto al presente en un electrodo de referencia (que es invariable) y de esta manera se traduce dicho voltaje a un valor de pH, según la ecuación de Nernst. Generalmente los voltajes obtenidos se obtienen en escalas de milivoltios (mV).

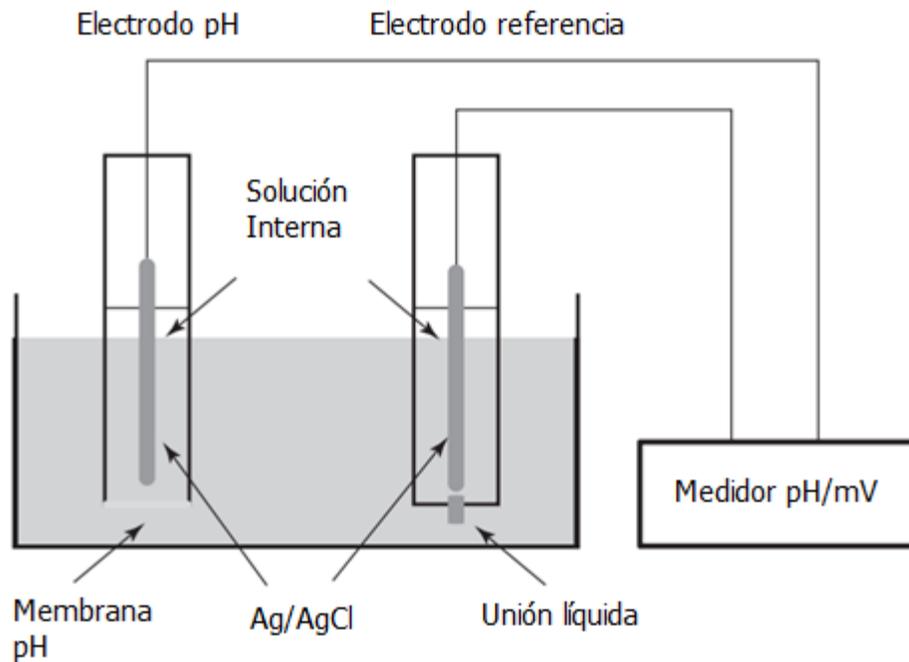


Figura 8: Esquema de un electrodo para medición de pH, donde un potencial se establece en la membrana de vidrio sensible a los iones H^+ con respecto al electrodo de referencia. Tomado de: Cleal, M. (2008)⁶².

Tomando como referencia la ecuación de Nernst:

$$E_{celda} = E_{ref} - \frac{RT}{nF} \log[H^+] \quad \text{Ecuación 6}$$

Con E_{ref} siendo el potencial del electrodo de referencia, R la constante de los gases, T la temperatura, F la constante de Faraday y n la cantidad de mol de electrones que participan. Se puede observar que, según la definición matemática de pH y asumiendo una temperatura específica de medición y que E_{ref} es constante; la ecuación se puede reacomodar de la siguiente manera:

$$E_{celda} = \text{Constante} - (\text{Pendiente}) * pH \quad \text{Ecuación 7}$$

Que tiene la forma de una función lineal con el pH como variable independiente y E_{celda} como variable dependiente. Este corresponde al fundamento básico para la operación de pHmetros a partir de curvas de calibración, esbozadas mediante estándares apropiados para esto. El ámbito lineal obtenido es utilizado para determinar el pH de una solución incógnita y la pendiente obtenida es un indicador de la calidad de respuesta del electrodo en milivoltios, ya que al compararla con el valor estándar teórico (a 298K) de 59.16 mV, se puede obtener un porcentaje de diferencia directamente relacionado a la calidad del sistema utilizado.⁶⁰

El electrodo de vidrio posee diversas variantes dependiendo de la muestra a la cual está destinada a operar. Hay electrodos de vidrio con membranas de ion selectivo, con diferentes formas y tamaños para muestras semisólidas, líquidos abrasivos, alimentos, aguas residuales y demás. El esquema de un electrodo de vidrio básico y sencillo, se observa en la *Figura 9*, donde el electrodo de referencia y el electrodo de vidrio se encuentran en un arreglo conjunto que hace más práctica su medición.

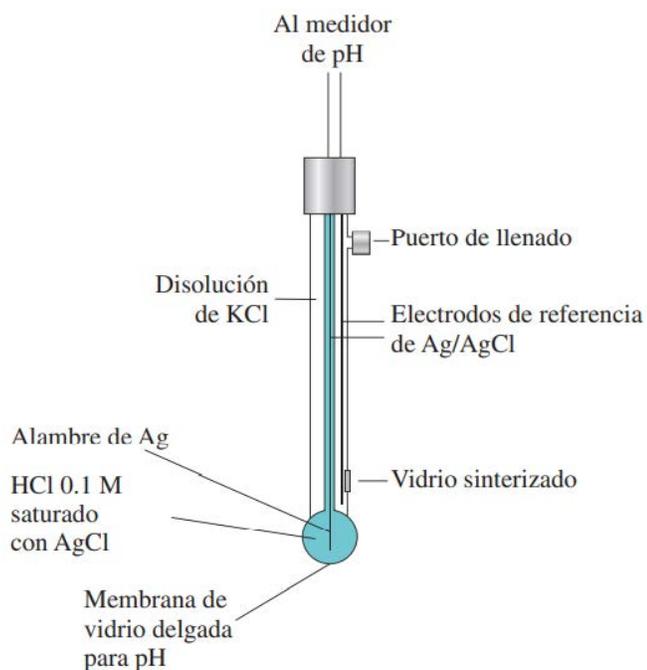


Figura 9: Diagrama de un electrodo de vidrio típico, acoplado a un pHímetro para la determinación del pH. Tomado de Skoog, D.; (2014)⁴⁹.

El pH es un parámetro utilizado en la mayoría de los campos de la química, ya que dependiendo de donde se analice puede ser indicador de composición de su matriz, su entorno, su naturaleza química y demás aspectos similares. A modo de ejemplo, en seguridad química, la categorización de sustancias corrosivas está directamente asociada al pH muy bajo o alto que pueda tener una sustancia, ya que la piel no permanece intacta en tales condiciones. A nivel microbiológico, la presencia de vida a muy altos o bajos pH es incluso considerado un extremófilo, lo que ha abierto investigaciones de sus formas de supervivencia y posibles aplicaciones. Similarmente, un cuerpo de agua o la tierra misma con un pH alto puede indicar sedimentos minerales cercanos, que pueden traducirse en investigaciones para el origen de la tierra y la vida misma. Asimismo, la sangre, la piel y los fluidos biológicos del cuerpo humano en general, deben tener un pH controlado y bien definido para mantener la actividad metabólica y enzimática regulada. La determinación precisa y exacta del pH es un parámetro fisicoquímico sumamente relevante y necesario en muchos campos de la investigación química. En el caso particular del alcohol en gel, este producto es aplicado directamente en la piel y en muchas ocasiones debe ser aplicado en reiteradas ocasiones en periodos cortos de tiempo, por lo que definir y poder cuantificar adecuadamente el pH del alcohol en gel es un ejercicio necesario.⁶²

1.5. Alcohol en gel

Generalidades

Los sanitizantes de manos son una alternativa práctica y eficaz para la desinfección de algunos virus y bacterias patógenas. Se categorizan según dos grandes variantes: los sanitizantes de manos con base de alcohol o sin base de alcohol. Los alcoholes más utilizados en sanitizantes de manos son el n-propanol, isopropanol y etanol; mientras que lo que no tienen de base el alcohol generalmente utilizan

cloruro de benzalconio, un desinfectante catiónico caracterizado por su grupo amonio cuaternario (Figura 10).¹⁸

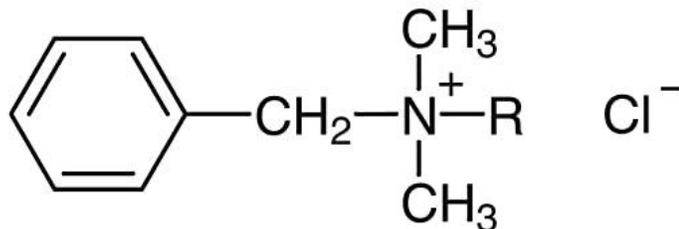


Figura 10: Molécula del cloruro de benzalconio, donde se muestra su grupo funcional característico: un amonio cuaternario cargado positivamente. Ejemplo de un ingrediente activo de desinfectantes no alcohólicos.

En el mercado mundial hay una clara predominancia en el uso de desinfectantes de manos con base en alcohol, por su efectividad y bajo costo de manufactura. A pesar de ser levemente irritantes para la piel, hay una menor incidencia relativa de dermatitis comparada con las alternativas no alcohólicas⁶³. No obstante, la investigación de formulaciones basadas en cloruro de benzalconio ha demostrado importantes puntos a favor, como una mayor efectividad desinfectante contra un amplio espectro de bacterias gram-positivas y gram-negativas, incluso superior que los que son base alcohol y con una concentración mucho menor en fórmula, como se puede observar en la *Figura 11*.⁶³

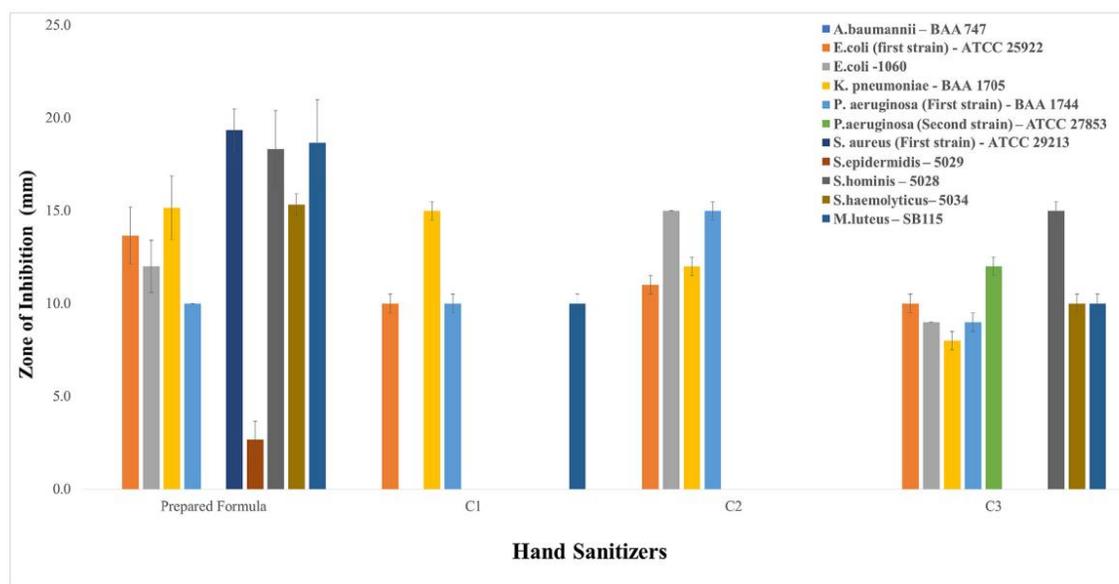


Figura 11: La fórmula preparada a base de cloruro de benzalconio como ingrediente activo, contra los productos comerciales C1, C2 y C3 los cuales son a base de alcohol (IPA, IPA+etanol y etanol). Es de notar que la formulación no alcohólica mostró mayor rendimiento antibacteriano tanto en zonas de inhibición como en cantidad de bacterias. Tomado de: Alhassan, H. (2021)⁴⁹.

A pesar de esto, hay otras consideraciones físicas a tomar en cuenta, como la viscosidad, la sensación luego de la aplicación, el pH y el tiempo de secado. Por ejemplo, se ha observado que los desinfectantes no alcohólicos tienen un tiempo de secado mayor, por lo que las personas tienden a utilizar menos cantidad para evitar la sensación incómoda en sus manos, lo que reduce la cantidad óptima y tiempo de contacto de la sustancia con las manos y, por lo tanto, puede presentarse una reducción de la efectividad antimicrobiana y antiviral.

La búsqueda de alternativas menos peligrosas para la población general es de interés especialmente en la época pandémica y post pandémica. Esto porque las intoxicaciones leves, medias e incluso altas (por el uso de metanol en fórmula) han sido reportadas incluso desde épocas prepandemia, pero han aumentado significativamente en los años recientes, como se puede observar en la *Figura 12*.⁶⁴

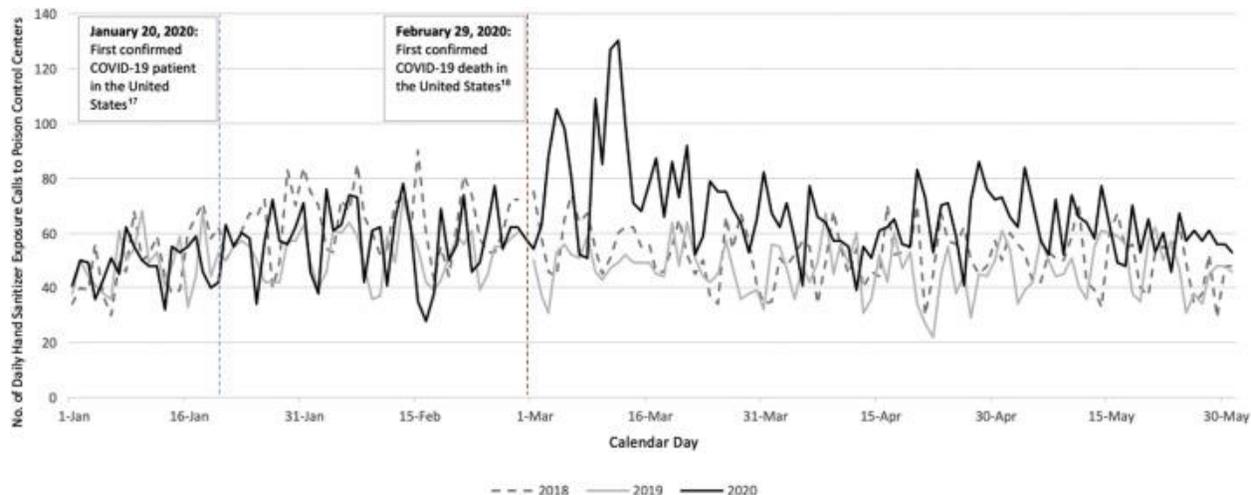


Figura 12: Llamadas a centros toxicológicos de los Estados Unidos relacionadas al uso inapropiado de desinfectantes de manos a base de alcohol. Tomado de: Hakimi, A. (2020)⁴⁹.

Es importante resaltar que no todos los alcoholes utilizados para la sanitización de manos desinfectan contra la totalidad de variantes virales y bacterias, y también se ha determinado que hay algunos alcoholes o compuestos que son más eficaces con algunos tipos de virus y bacterias que otros⁶². Esto es un indicador que el mecanismo desinfectante no está completamente elucidado y comprenderlo a cabalidad abre alternativas para nuevas formulaciones y productos. A pesar de esto, se sabe que los alcoholes interactúan con las membranas celulares causando daño, inhibición del ARN mensajero, inhibición de síntesis proteica por efectos en los ribosomas y también desnaturalización de algunas proteínas esenciales⁶².

Formulaciones propuestas

La OMS indica que el lavado de manos con agua y jabón es la mejor opción que se tiene para desinfectarse, sin embargo, reconoce la efectividad y practicidad del uso de desinfectantes en gel⁶⁵. Por esto, con base en diversos estudios⁶⁶, la institución mundial ha propuesto una formulación base para garantizar la antisepsia de manos, descritas en el Cuadro I:

Cuadro I: Formulación propuesta por la OMS para la desinfección de manos efectiva.

Componente	Cantidad (g)
Alcohol*	72 g
Glicerina	4 g
Carbómero	0.5 g
Trietanolamina	3.5 g
Agua purificada	20 g

*alcohol etílico o isopropanol.

Es importante que la concentración del alcohol se mantenga dentro de los límites recomendados, puesto que se ha determinado una dependencia de la concentración presente en fórmula y su capacidad desinfectante⁶⁷. Los estudios para determinar la efectividad del etanol en diversas concentraciones se ramifican en dos: virus con y sin envoltura; y su categorización será una de tres posibles: posee actividad viricida (cubre todos los virus importantes de la medicina humana), posee actividad viricida en virus con envoltura y posee actividad espectral viricida limitada. Esta distinción depende en gran medida de su concentración⁶⁸. En virus con envoltura, el etanol es activo en concentraciones desde 42.6 % (fracción en volumen) contra el SARS coronavirus, MERS coronavirus, virus del ébola, influenza tipo A, virus del zika, VIH, herpes simplex tipo 1 y 2, entre otros. No obstante, para el virus de la hepatitis C su actividad comienza a manifestarse a partir de 73.6 %⁶⁸. Para virus sin envoltura, destaca que el isopropanol no es un alcohol efectivo para la desinfección incluso en concentraciones elevadas, y que el etanol sí lo es, pero las concentraciones son diferentes para gran variedad de virus. Por ejemplo, para el adenovirus, una concentración de 45 % comienza a mostrar efectividad antiviral; pero para diversos tipos de enterovirus como el echovirus, se necesita una concentración de etanol 90 % o superior para observar actividad antiviral⁶⁸. De estos datos podemos concluir que el etanol es efectivo contra una variedad sumamente elevada de virus y bacterias, pero que esta efectividad se ve determinada por su concentración y tiempo de contacto, lo que inclina a formuladores a utilizar concentraciones elevadas mayores a 70 % (fracción en volumen) de etanol, agregando alguna sustancia que forme un gel, de manera que el contacto con las manos sea más duradero y por lo tanto, efectivo.

Es por esta razón, que este trabajo pretende realizar un material de referencia en alcohol en gel que permita a las autoridades sanitarias conocer si los formuladores en el mercado costarricense poseen procesos controlados y las capacidades técnicas requeridas para determinar la concentración alcohólica de sus productos y así garantizar y controlar que ésta se encuentra dentro de los ámbitos propuestos en el RTCR 501:2020. De esta manera, la población que utilice sus productos está protegida contra un amplio espectro de virus nocivos, incluyendo el causante de la pandemia del 2020.

Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Desarrollar un material de referencia certificado en su contenido etanólico y pH de matriz polielectrolítica, que pueda ser utilizado para el aseguramiento de la calidad de las formulaciones comerciales viricidas que ayuden a contener la propagación del virus SARS-CoV-2.

2.2. Objetivos específicos

- Producir un candidato a material de referencia (CRM) a partir de un lote de alcohol en gel, cuyos constituyentes tengan sus propiedades químicas y físicas definidas.
- Validar las metodologías de análisis cuantitativo a utilizar, específicamente Cromatografía de Gases con Detector de Ionización por Llama (GC-FID) y espectrometría con Transformada de Fourier con acoplamiento ATR-S (Reflectancia Total Atenuada).
- Cuantificar de manera metrológica el pH y el contenido de etanol presente en el CMR mediante las técnicas analíticas validadas en el punto anterior y la técnica de densimetría de oscilación armónica realizada en el LCM.
- Evaluar la homogeneidad del lote y estabilidad en el tiempo del CMR, haciendo uso de estos para estimar la incertidumbre final asociada al valor caracterizado.
- Determinar, a partir de los resultados obtenidos, si el CMR transiciona a MRC.

Capítulo 3. Metodología

El desarrollo de este Trabajo Final de Graduación se llevó a cabo en las instalaciones de Sur Química de Costa Rica (en La Uruca) y en las instalaciones del Laboratorio Costarricense de Metrología (LCM, ubicado en San Pedro de Montes de Oca). La preparación de los patrones de calibración para la validación de metodologías descritas se realizó en el departamento de Metrología Química del LCM, al igual que las mediciones de densimetría de oscilación armónica. Las mediciones realizadas de cromatografía de gases con *FID* y *FTIR* se llevaron a cabo en el Laboratorio Instrumental de Sur Química. La producción del lote, envasado y etiquetado del Candidato a Material de Referencia, se realizó en la Planta de Cosméticos de Sur Química, destinada a la producción de este tipo de productos. El almacenamiento y posterior uso son exclusivos del LCM y el estudio posterior realizado por la institución no es parte del alcance de este proyecto.

3.1. Alianza Público-Privada.

Al involucrar dos instituciones diferentes para desarrollar el proyecto, se redactó, por parte de las áreas competentes y respectivas, un documento legal llamado Alianza Público-Privada (APP) misma que define el intercambio de intereses, entre ellos y más importante, la producción y certificación del CMR. La APP se revisó y aprobó por parte del departamento legal de ambas instituciones, lo que le brindó solidez y respaldo al proyecto en cuestión. En esta Alianza se define: el objetivo general y específicos, las obligaciones, la vigencia, las causas anormales por el cual el convenio podría culminar, los responsables de llevar a cabo lo establecido, la estimación de costos, responsabilidades, derechos intransferibles, modificaciones y domicilios contractuales; firmados por la directora ejecutiva del LCM Sra. Dahianna Marín Chacón y el apoderado generalísimo de Sur Química, el Sr. Adolfo Fernández Brenes.



Figura 13: Ceremonia realizada en las instalaciones del LCM, participando de izquierda a derecha: el Dr. Bryan Calderón, MSc. Dahiana Marín (por el LCM); Sra. Victoria Hernández (ex-ministra del MEIC periodo 2018-2022); Ing. Allan Torres y B.Q. Fernando Aragón.

3.2 Validación de los métodos de ensayo

A partir de los resultados obtenidos con las metodologías analíticas propuestas para la cuantificación del contenido alcohólico (*GC-FID*, densimetría y *FTIR-ATR*), se certificará un material que aportará un valor de referencia para que diversos laboratorios estimen el sesgo en sus mediciones y verifiquen que sus capacidades analíticas se encuentran conformes con lo especificado en el reglamento RTCR 501:2020. Es por esta razón que es imprescindible contar con metodologías validadas y documentadas en su evidencia objetiva. Para el caso concreto de densimetría, no se valida en este trabajo puesto que el LCM, como dueño del equipo, tiene su metodología validada de previo. En lo que respecta a la medición de pH, no se realiza una validación ya que al ser una técnica de medición y no precisamente un método analítico, basta con la calibración y verificación con estándares certificados para asegurar que las mediciones son veraces y confiables.

Preparación de estándares de calibración – *GC FID*.

Para la preparación de los estándares de calibración para *GC FID*, se utilizó como referencia el método propuesto por la *ILIADe* 143:2021 – CLEN Method⁶⁹. El material de referencia certificado que brindó la trazabilidad metrológica en el proceso de validación corresponde a una disolución etanol-agua del NIST (certificado: SRM 2900). Cada estándar se preparó con balones aforados de 25.00 mL que se encuentran a masa constante, medidos con una balanza analítica con precisión de 0.1 mg. Se preparó una disolución madre de etanol a partir del estándar concentrado (código asignado: DM1), midiendo la masa del balón seco y limpio de 25.00 mL, luego la masa del mismo balón con una cama de agua destilada. Posteriormente, se abrió la ampolla y se agregó el contenido de esta con una pipeta Pasteur midiendo la masa agregada total en el balón. Finalmente, se determinó la masa una vez aforado con agua destilada (todas las anteriores con el balón y su tapa). Este proceso de dilución se realizó en no más de 120 segundos luego de abrir el MRC, por especificaciones del fabricante. Una vez preparada la disolución madre, se procedió a preparar los estándares de calibración. Para el caso específico de *GC-FID*, se obtuvo la masa de cada balón aforado de 25.00 mL a utilizar (5 diferentes), limpios y secos. Se agregó una cama de agua destilada al balón y se midió su masa. Se agregó una masa de 0.2847 g, 0.8913 g, 1.5043 g, 2.2115 g y 2.7121 g de la disolución madre preparada a cada balón aforado y se midió su masa total (balón con agua y tapa). Con una micropipeta calibrada de (100 a 1000) μL , se agregó a cada uno de los balones, 1000 μL de 1-butanol grado estándar analítico, que tiene como función ser el estándar interno, y se anotó la masa obtenida. Finalmente se aforó con agua destilada y se obtuvo la masa final (cada patrón se identificó como G1, G2, G3, G4 y G5). Todas las mediciones de masa se realizaron con la tapa del balón colocada.

Preparación de estándares de calibración – *FTIR*.

Para la preparación de los estándares de calibración para *FTIR-ATR*, se utilizó la disolución madre preparada en la sección anterior con código DM1. A partir de esta solución madre, se realizaron los patrones, identificados como F1 y F2, se obtuvo la masa de cada balón aforado de 10.00 mL a utilizar (dos en total), limpios y secos. Se agregó una cama de agua destilada al balón y se midió su masa. Se agregó una masa de 2.7527 g y 4.2836 g de la disolución madre preparada a cada balón aforado y se midió su masa total (balón con agua y tapa). Finalmente se aforó con agua destilada y se obtuvo la masa final.

Preparación de estándares de calibración – *QC's*.

Para la preparación de los estándares para el estudio de repetibilidad y precisión intermedia, se preparó una disolución madre según el procedimiento descrito anteriormente en la sección "Preparación

de estándares de calibración – *GC FID*” pero con una nueva ampolla del MRC. Esta nueva disolución madre será identificada como DM2. A partir de DM2, para el caso concreto de *GC-FID*, se prepararon 3 estándares de concentración similar al punto 1, punto 3 y punto 5 de la curva de calibración preparada en la sección “Preparación de estándares de calibración – *GCFID*”; en balones de 25.00 mL, al agregar 0.3003 g, 1.5643 g y 2.8383 de la disolución madre DM2 y determinar su masa total. Luego, se agregó 1000 μL de estándar interno de 1-butanol, con una micropipeta calibrada de (100 a 1000) μL y se midió su masa. Finalmente, se aforó con agua destilada y se determinó la masa final. Las disoluciones preparadas se separaron en viales con septum, de manera que se dispuso de 10 unidades de cada patrón. Para el caso concreto de *FTIR*, se preparó un estándar de concentración similar al punto intermedio de la curva por *bracketing* preparada en la sección anterior; en balones de 10.00 mL, al agregar 3.6986 g de la disolución madre DM2 y determinar su masa total. Finalmente, se aforó con agua destilada y se determinó la masa final. La disolución preparada se separó en viales con *septum* de manera que se dispuso de diez unidades del patrón.

El almacenamiento de los estándares y disoluciones madre se basó en la recomendación del NIST, del certificado de calibración en cuestión: el cual debe permanecer en ámbitos de (4 a 10) °C tapados de la luz solar directa. Se almacenaron en Sur Química, en un refrigerador controlado con una termocupla calibrada, entre (4 a 6) °C.

Las ecuaciones para calcular la concentración como fracción en masa expresado como porcentaje, por el método de *GC-FID* se presentan a continuación. Para la disolución madre:

$$C_n (\% \text{ en masa}) = \frac{\text{masa estándar adicionado} * \% \text{ en masa del estándar}}{\text{masa líquida total}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Para cada estándar analítico:

$$C_n \text{ estándar } (\% \text{ en masa}) = \frac{\text{masa Dsln madre adicionada} * \% \text{ en masa Dsln madre}}{\text{masa líquida total}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Condiciones operativas para la medición de estándares y muestras.

Los equipos a utilizar para la validación de metodologías y posterior medición de muestras se especifican en el Cuadro II a continuación.

Cuadro II: Información del cromatógrafo de gases y del espectrómetro infrarrojo a utilizar en la validación de metodologías y certificación del MR.

Equipo	Marca	Modelo	Fecha de última verificación / Reporte N° *	Número de serie
Cromatógrafo de gases	Shimadzu	GC 2014	26 de agosto 2022 / 18531	C119453
Espectrómetro infrarrojo	Shimadzu	IR Spirit	26 de agosto 2022 / 18530	A224158

*Revisión externa por la empresa externa Electrónica Centroamericana S.A.

Las condiciones operativas, tanto para *GC-FID* y *FTIR-ATR*, se sintetizan en el Cuadro III y Cuadro IV a continuación. Estas condiciones deben permanecer constantes a lo largo de la validación y de la medición de muestras, con el fin de aumentar la repetibilidad.

Cuadro III: Condiciones operativas del cromatógrafo programadas para la validación de metodologías y posterior medición de muestras.

Parámetro	Condición
Gas de arrastre	Nitrógeno
Gas de llama	Hidrógeno/Aire cero
Presión de los gases (kPa)	60 (N ₂), 70 (H ₂), 35 (aire cero)
Temperatura horno (°C)	63
Temperatura inyector (°C)	160
Rampa	Hasta 110 °C, a 20 °C/min (<i>hold time</i> 1.5 min)
Inyección	Split
Flujo de columna (mL/min)	1.5
Tipo de columna	Capilar CP SIL-5-CB
Velocidad lineal (mL/min)	30.8
Flujo total (mL/min)	32.5

Cuadro IV: Condiciones operativas del espectrómetro infrarrojo programadas para la validación de metodologías y posterior medición de muestras.

Parámetro	Condición
Número de Scans	45
Resolución (cm ⁻¹)	4
Ámbito (cm ⁻¹)	400 a 4000
Apodización	Happ-Genzel
Acoplamiento	Q-ATR

Parámetros de desempeño en la validación de metodologías.

Una vez preparados los estándares de calibración se procede a desarrollar cada parámetro de validación, los cuales corresponden a los descritos en el siguiente cuadro, basados en la guía Eurachem⁴⁵ y lo descrito en la metodología *LIADe* 143:2021 – CLEN Method⁶⁹. La descripción de lo que se debe validar, con un procedimiento y un criterio de aceptación se adjunta en el Cuadro V a continuación.

Cuadro V: Descripción de los requerimientos propuestos para los parámetros de desempeño a validar en cada método.

Parámetro	¿Qué se debe validar?	Procedimiento propuesto	Criterio de aceptación propuesto
Selectividad	<p><i>GC-FID</i>: que el equipo en cuestión detecte el analito (etanol) en un tiempo de retención diferente al estándar interno (1-butanol) y determinar la selectividad del método para cuantificar etanol frente a mezclas etanol-isopropanol-agua.</p> <p><i>FT-IR</i>: que el espectro obtenido para etanol coincida en no menos de 95% con las bases de datos reportadas para etanol absoluto.</p>	<p><i>GC FID</i>: Inyección de 5 patrones de concentraciones diferentes con estándar interno. Inyección de una mezcla de agua-etanol-isopropanol. Se determina con un análisis visual que no haya traslapes entre el estándar interno y el etanol, así como del etanol con el isopropanol.</p> <p><i>FTIR</i>: medición directa de un patrón de concentración intermedia. Se determina, mediante el uso del software del equipo, la relación cuantitativa entre el espectro obtenido y el almacenado en bases de datos.</p>	<p><i>GC FID</i>: que el etanol y el estándar interno muestren diferentes tiempos de retención y que el método sea capaz de cuantificar etanol en mezclas etanol-isopropanol-agua.</p> <p><i>FTIR</i>: que coincida el espectro al menos en un 95 % con las bases de datos para etanol.</p>
Linealidad	<p><i>GC-FID</i>: que la relación de áreas contra concentración sea lineal. Determinar si el modelo es homoscedástico, para definir el mejor modelo a ser ajustado, mínimos cuadrados ordinarios (OLS) o ponderados (WLS).</p> <p><i>FTIR</i>: al ser un bracketing, no se analiza linealidad.</p>	<p><i>GC-FID</i>: Inyección de 5 patrones de concentración conocida en etanol por quintuplicado, para cuantificar y esbozar una gráfica lineal siendo el eje 'x' la concentración de patrones y el eje 'y' la razón de áreas obtenidas del cromatograma.</p>	<p><i>GC-FID</i>: Coeficiente de correlación no menor a 0,9950. La determinación de modelo OLS o WLS no es un parámetro de aceptación.</p>
Límites de Detección y Cuantificación (<i>LOD</i> y <i>LOQ</i> , respectivamente)	<p><i>GC-FID</i>: que los límites de cuantificación y detección se mantengan menores al patrón de menor concentración de la curva de calibración.</p> <p><i>FTIR</i>: al no usar concentraciones altas (>10 % en masa) no hay riesgo</p>	<p><i>GC-FID</i>: A partir de la curva de calibración, calcular los <i>LOD</i> y <i>LOQ</i> según las ecuaciones:</p> $LOD = 3 \cdot \frac{S_{y/x}}{b}$ $LOQ = 10 \cdot \frac{S_{y/x}}{b}$ <p>Siendo "$S_{y/x}$" el estimador de errores aleatorios en la dirección "y"; y "b" la pendiente.</p>	<p><i>GC-FID</i>: Límites de cuantificación y detección se mantengan menores al patrón de menor concentración de la curva de calibración.</p>

	de tener errores Tipo I y Tipo II.		
Veracidad	<p><i>GC-FID</i>: que el método cuantifique el valor de concentración tomado como verdadero, según el certificado del MRC de etanol.</p> <p><i>FT-IR</i>: que el método cuantifique el valor de concentración tomado como verdadero, según el certificado del MRC de etanol.</p>	<p><i>GC-FID</i>: Inyección de 8 réplicas de cada <i>QC</i> (R1, R2 y R3).</p> <p><i>FT-IR</i>: Medición de 8 réplicas del <i>QC</i> (R4).</p> <p>En ambos casos, se determina la veracidad a través de un sesgo, es decir, una diferencia entre el valor obtenido y el valor certificado del MRC.</p>	<p><i>GC-FID</i>: Este parámetro de desempeño se encuentra conforme al obtener un resultado de sesgo porcentual no mayor a 3 %.</p> <p><i>FT-IR</i>: Este parámetro de desempeño se encuentra conforme al obtener un resultado de sesgo porcentual no mayor a 3 %.</p>
Precisión	<p><i>GC-FID</i>: que el método presente pequeñas variaciones entre resultados de una misma muestra.</p> <p><i>FT-IR</i>: que el método presente pequeñas variaciones entre resultados de una misma muestra.</p>	<p><i>GC-FID</i>: Inyección del patrón intermedio en mismo equipo, mismo analista, pero en periodos de un mes de diferencia (factor tiempo, para análisis de precisión intermedia).</p> <p><i>FT-IR</i>: Medición del patrón intermedio en mismo equipo, mismo analista, pero en periodos de un mes de diferencia (factor tiempo, para análisis de precisión intermedia).</p>	<p><i>GC-FID</i>: a partir de un ANOVA de un factor, obtener la desviación estándar relativa (%) de repetibilidad (dentro de grupos) menor a 0.50 % y de precisión intermedia menor a 1.90 %.</p> <p><i>FT-IR</i>: a partir de un ANOVA de un factor, obtener la desviación estándar relativa (%) de repetibilidad (dentro de grupos) menor a 0.50 % y de precisión intermedia menor a 1.90 %.</p>
Incertidumbre de medida	<p><i>GC-FID</i>: que presente una incertidumbre asociada válida.</p> <p><i>FT-IR</i>: que presente una incertidumbre asociada válida.</p>	Cálculo de la incertidumbre según procedimientos de la GUM considerando los aportes de incertidumbre según la ecuación final.	Incertidumbre expandida menor a 3.0 % en masa expresada como porcentaje, con un factor $k=2$ para un 95 % de cobertura, basado en una distribución normal.

3.3. Preparación del lote del CMR.

El lote del CMR se fabricó en la Planta de Cosméticos de Sur Química S.A. el lunes 24 de enero del 2022. **Se realiza bajo la Orden de Producción "OP-1716437" y el lote granel 000518329.** La información de las materias primas se adjunta en el Cuadro VI siguiente.

Cuadro VI: Materias primas utilizadas con su información de marca y lote, para producir el CMR.

Materia Prima	Marca	Lote
Agua desionizada	No posee lote ni marca, puesto que se desioniza a nivel interno, lleva controles fisicoquímicos de calidad del agua los cuales se reportan en el <i>Cuadro VII</i> .	
Etanol	FANAL	L11-ASTA-1-I-32-2021
TC Carbomer 351	Guangzhou Tinci Materials Technology	J200403307
Trietanolamina	The Dow Company	D676L8VT01
Glicerina USP 99.5%	Meridional TCS Industria e Comercio de Oleos S.A.	VK030622

Cuadro VII: Controles fisicoquímicos realizados al agua desionizada que supe la planta de cosméticos para la fabricación de sustancias, del 24 de enero 2022.

Parámetro fisicoquímico	Resultado	Ámbitos	Unidades
pH	7.0	6.0 a 8.0	1
Temperatura	27.2	18 a 30	°C
Conductividad eléctrica	294	0 a 400	uS/cm
Dureza Total	18	0 a 75	mg/kg
Color aparente	20	0 a 15	U Pt-Co
Turbidez	0.23	0 a 5	NTU
ATP	6	0 a 10	URL
Cloro libre	0.14	0 a 3	mg/kg
Cloro total	0.16	0 a 6	mg/kg
Cloro combinado	0.02	0 a 3	mg/kg
Alcalinidad total	124	0 a 125	mg/kg
Hierro total	0.1	0 a 0.1	mg/kg
Cobre	0.1	0 a 0.1	mg/kg

Los insumos críticos (Figura 14) para esta producción corresponden a tanques de acero inoxidable para mezclado, dispersor de acero inoxidable para alta resistencia, propela de aspas de acero inoxidable, espátulas planas de acero inoxidable, bombas hidráulicas, dosificadora, tubería de acero inoxidable para transporte de material, selladora para *liner* inductivo, balanza para dosificación de producto terminado (resolución: 0.1 g) y para pesaje de materias primas, filtro de tela con tamaño de poro 150 μm (PEM 150 P1S-H), cajas de cartón corrugado (245 mm largo, 185 mm alto y 166 mm ancho), cinta adhesiva, etiquetas adhesivas diseñadas para el CMR, botellas de polipropileno con capacidad para 350 mL (código interno: 183056) y tapas con *liner* inductivo (código interno SUR: 12209).



A)



B)



C)



D)



E)

Figura 14: Ejemplo de algunos insumos y equipos críticos empleados para la producción del CMR: A) Caja de cartón para embalaje. B) Agitador industrial. C) Tina de acero y balanza de alta capacidad. D) Balanza granataria para pesaje de producto terminado botella y etiqueta. E) Balanza para pesaje de materias primas.

La etiqueta del CMR (Figura 15) se realizó de forma conjunta con el LCM, donde se definió su nombre, el logo, el código QR que dirige a la página web donde se encuentran los informes de valores certificados, código del material (en este caso corresponde al MQ-601), el lote y su volumen nominal.



Figura 15: Versión final de la etiqueta aprobada por LCM para la identificación y futura distribución del MRC.

La planta de cosméticos sigue rigurosos estándares para garantizar inocuidad en sus operaciones. La planta requirió de una desinfección previa de los ocupantes en sus manos y uso de gabachas limpias para permanecer dentro. El uso de cofia para cabello y pies completa la indumentaria requerida. La tina a utilizar pasó por un proceso de desinfección que consistió en tres lavados con agua desionizada para retirar el producto remanente y una limpieza con una solución hidroalcohólica al 70 % (fracción en masa expresada como porcentaje). La tina se seca y queda disponible para el uso.



Figura 16: Tina utilizada para la producción del CMR, donde se observa el equipo de protección personal del operario y el encargado de producción, que en este caso corresponde a mí persona.

Según procedimientos internos de Sur Química, las materias primas se entregaron en la Planta de Cosméticos en forma de alistos (Figura 17), que se definen como bolsas de cada materia prima independiente debidamente pesada en la Bodega de Materia Prima, de manera que el operador realice una segunda verificación de masa a la hora de cargar el material, pero no deba manipular grandes envases, recipientes o empaques de la materia prima original. El operador determinó la masa de cada alisto contra las indicaciones del parte de producción (indicación establecida de cantidades y formas de adición de materiales) indicando que cada componente coincide en sus masas con una exactitud de ± 0.1 kg con respecto al parte de producción.



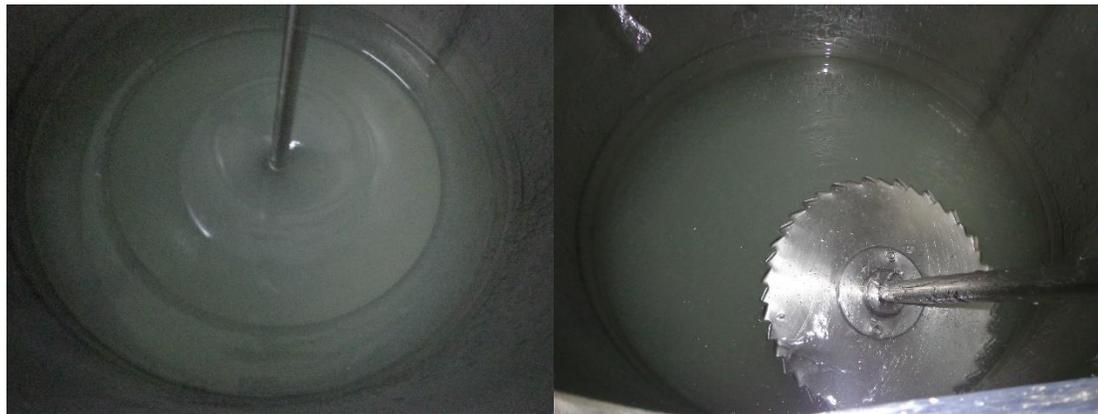
Figura 17: Alistos que se brindó de los materiales en fórmula, exceptuando el agua desionizada que proviene de tuberías al igual que el etanol.

Se realizó la adición del ácido poliacrílico al agua desionizada, con agitación fuerte utilizando un dispersor a 2000 revoluciones por minuto. Una vez que no se observan grumos, se agregó el etanol (Figura 18 A) con agitación baja. Una vez agregado en su totalidad, se subió la agitación a 1200 revoluciones por minuto por cinco minutos (Figura 18 B).



A. B.
Figura 18. A) Adición controlada de etanol sobre la balanza de plataforma, proveniente del tanque a través de las tuberías. B) Dispersor a 1200 revoluciones por minuto para mezclar el etanol, es de notar que se aprecia transparencia y consistencia líquida fluida.

Posterior a ese tiempo, se agregó la trietanolamina para la formación del gel gelifica. La agitación se sube a 2500 revoluciones por minuto por diez minutos hasta que no haya presencia de grumos (Figura 19).



A. B.
Figura 19. A) Producto a alta velocidad posterior a la adición de la trietanolamina, donde se observa un claro cambio de apariencia a viscosa y translúcida. B) Dispersor utilizado para este tipo de agitación, utilizado por su alta fricción.

Transcurrido ese tiempo, se agregó la glicerina y agua desionizada para completar la formulación. Se agitó fuerte por cinco minutos y se cambió el dispersor por una propela de aspas (Figura 20). Se inició la agitación por dos horas con la tina tapada con plástico para evitar evaporación del etanol. Culminado este proceso, se tomó una muestra para analizar el control de calidad asociado al producto.



Figura 20: Propela de aspas utilizado para la agitación posterior a la adición de las cargas, propuesto para garantizar mayor homogeneidad del lote fabricado. Tiempo de agitación: dos horas.

Una vez aprobado se procedió con el envasado, el cual se realizó desde la tina, a través de unas tuberías conectadas a una bomba que envía el producto a una dosificadora sobre una balanza granataria (resolución: 0.1 g), donde se introdujo entre (300.0 a 330.0) g de producto por envase (Figura 27).



Figura 21: Arreglo de balanza a nivel de la tubería conectada a la tina, con el ítem del CMR pesando 310.0 g de muestra por envasado utilizado.

La botella, código Sur, 183056, es una botella PET blanca opaca, con tapa que posee un *liner* inductivo, que con la utilización de un sellador mantiene un cierre hermético de aluminio con adhesivo.



Figura 22: Encargado de producción tapando las botellas para proceder a sellar con *liner* inductivo.

Se introdujeron doce botellas por caja de cartón corrugado, siendo rotuladas numéricamente conforme se van empacando, siendo así la caja #1 la que contiene las primeras doce muestras del lote, la caja #2 la que contiene las siguientes doce muestras del lote y de esa manera sucesivamente.



A.

B.

Figura 23. A) Producto envasado final, con un liner sellado por inducción garantizando cierre hermético. B) Cajas almacenadas en tarimas, numeradas según salían unidades de envasado, con su información de orden de producción, código y fabricante.

3.4 Caracterización del CMR.

El proceso de caracterización se realizó en el LCM según el método de densimetría utilizado y en Sur Química S.A. utilizando el método validado de cromatografía de gases (*GC-FID*) para contenido de etanol, según las condiciones de equipo definidas en el Cuadro III y el pHímetro calibrado para medición

de pH. No se utiliza el método de *FTIR-ATR* al no cumplir con los parámetros de desempeño, explicado a detalle en secciones siguientes. Al almacenar 12 unidades por caja y rotular cada caja conforme se envasa el lote; el muestreo elegido, según las indicaciones de los expertos del LCM, corresponde a un muestreo probabilístico aleatorio estratificado, donde cada subgrupo de muestras corresponde a una caja rotulada.

Se utilizaron 6 muestras del lote, donde cada muestra se realiza por duplicado, para un total de 12 destilaciones, **identificadas con la codificación "C#.#", donde "C" corresponde a Caracterización, el primer "#" corresponde a la identificación de la botella y el segundo valor de "#" se refiere a la réplica para esa unidad.** Como ejemplo, si la botella número 3 tuviese dos destilados independientes, cada destilado se rotularía **como "C3.1" y "C3.2"**.

Un diagrama de proceso donde se sintetizan los puntos principales se muestra en la Figura 26.

Preparación de la muestra de análisis.

Cada unidad se abrió e inmediatamente se procedió a medir la masa inicial (aproximadamente 50 g) en el balón de destilación pre-pesado de 250 mL, se montó el sistema de destilación simple, se agregó una punta de espátula de NaCl grado reactivo al producto y se inició el calentamiento con agitación constante. El balón colector corresponde a un balón aforado de 100.00 mL pre-pesado con tapa que se encuentra inmerso en un baño a 5 °C, con el fin de evitar volatilización del analito. El equipo utilizado se observa en la Figura 24.



Figura 24: Sistema de destilación simple utilizado en Sur Química para la destilación de las muestras. Las mangueras del condensador se encuentran unidas a un recirculador con agua helada.

El proceso de destilación se realizó en un tiempo promedio de 40 min por muestra, con un calentamiento que se mantiene constante a 75 °C. Una vez que la temperatura del sistema sube progresivamente pasando los 80 °C, es un indicador que el etanol de la muestra inicial se ha evaporado en su totalidad y se detiene el calentamiento. Se realizó un lavado por triplicado del condensador con agua destilada, para asegurar entrada total del analito en el balón recolector. El calentamiento del sistema debe ser tal que la temperatura de destilación se alcance, pero no tan elevada que pueda quemar la muestra.

Una vez retirado el balón colector del sistema, se aforó, se secó totalmente y se atemperó por 3 h a 20 °C para la medición de masa. Se midió su masa una vez seco y atemperado. Este proceso se repitió de igual manera para los estudios de homogeneidad entre y dentro botellas y estabilidad a corto plazo.

Dilución gravimétrica para *GC-FID*.

Una vez obtenido el destilado, se debe diluir de manera que se ajuste a los valores de la curva de calibración para *GC-FID*. Para esto, se tomó un balón aforado de 25.00 mL limpio y seco para determinarle su masa inicial. Se agregó aproximadamente 10 g de agua destilada, seguidamente se agrega una cantidad del destilado entre (1.5 a 1.7) g medidos con exactitud de 0.1 mg. Luego, se procedió con la adición de 1000 μ L de 1-butanol como estándar interno (se agrega con micropipeta, la masa correspondiente a medir sería 0.8050 g) y se determinó su masa. Finalmente, se aforó con agua destilada y se determinó su valor de masa final aforado. Se agitó bien y la muestra se encuentra lista para inyección. Una muestra de aproximadamente 10 mL se envía al LCM para realizar la medición de densidad.

Medición de concentración de etanol con *GC-FID*.

La determinación de la concentración de etanol en el CMR se realizó mediante una curva de calibración de 5 puntos inyectados por quintuplicado en el cromatógrafo, el 23 de abril del 2022 en el Laboratorio Instrumental de Sur Química, por un mismo operador, mismo equipo, mismo día; por lo que se realizó en condiciones de repetibilidad. Esta curva de calibración comprendió patrones de concentraciones entre (0.35 a 3.41) %, fracción en masa expresada como porcentaje, y un *QC* de concentración intermedia, de 1.98 %. Se inyectó manualmente cada patrón por quintuplicado, en las condiciones cromatográficas definidas por el Cuadro III y se confeccionó una curva de calibración. Luego, se inyectó el *QC* por duplicado. Seguidamente, se inyectó C1.1, C1.2, C2.1 por duplicado para luego inyectar el *QC* por duplicado. Se procedió con la inyección de C2.2, C3.1, C3.2 y *QC*; por duplicado. Se inyectó C4.1, C4.2, C5.1 y el *QC* por duplicado. Finalmente, se inyecta C5.2, C6.1, C6.2 y el *QC*; por duplicado. De esta manera se alternó el *QC* entre muestras, cada 3 muestras (6 mediciones), controlando la exactitud del equipo.

A las muestras se les determinó la concentración (como fracción en masa expresada como porcentaje) mediante una interpolación en la función lineal de la curva de calibración y considerando los factores de dilución del destilado y de la muestra inicial. Las ecuaciones para el cálculo de concentración de etanol de las muestras se describen a continuación.

$$Cn_{dilución} (en\ masa) = a \cdot \frac{masa_{liquida}}{masa_{etOH}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Con a: resultado de la interpolación de la curva de calibración, %; $masa_{liquida}$ la masa líquida del balón aforado de la dilución gravimétrica, gramos; y $masa_{etOH}$ la masa medida del destilado, gramos.

$$Cn_{muestra} (en\ masa) = Cn_{dilución} \cdot \frac{masa_{aforada}}{masa_{inicial}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Con $Cn_{dilución}$: resultado de la Ecuación 10, %; $masa_{aforada}$ la masa líquida del balón colector aforado de la destilación, gramos; y $masa_{inicial}$ la masa medida de la muestra gelificada del CMR, gramos.

Determinación del pH.

La cuantificación del pH se realizó en el Laboratorio de Biociencias de Sur Química el 25 de enero del 2022. El equipo utilizado corresponde a un pHímetro marca Oakton, modelo: Benchtop 700 con un electrodo de vidrio marca Hanna Instruments, código: HI1053B (Figura 25). Este electrodo combinado es ideal para muestras viscosas como el alcohol en gel, puesto que posee forma cónica para mejorar la penetración dentro de las muestras y posee una unión triple de cerámica que permite tener un mayor flujo de electrolitos en la celda de referencia hacia la muestra. Este alto flujo proporciona una respuesta rápida y mayor estabilidad de las mediciones en soluciones viscosas y de baja conductividad. El equipo y electrodo se calibraron con soluciones buffer de pH certificado en (4.00 ± 0.02) , (7.00 ± 0.02) y (10.00 ± 0.02) a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, trazables al MRC del NIST con certificados número: HC16383775, HC16685577 y HC15167200; respectivamente. Estos son marca Certipur® de Supelco-Sigma Aldrich. Las soluciones buffer se abrieron el día del análisis, luego de dejarlos atemperando a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.



Figura 25: Electrodo de vidrio código: HI1053B, utilizado para determinar el pH del CMR.

El pHímetro se encendió y se permitió el reposo del equipo por 30 min antes de las mediciones. Se abrieron las soluciones estándar y se realizó una calibración en los tres puntos iniciando con el pH 7.00 y continuando con el pH 4.00 y 10.00. Posteriormente se realizó una verificación de los tres puntos de pH en las unidades de pH (1) y mV, para poder esbozar una curva de mV contra pH.

Una vez el equipo calibrado y verificado, se realizó la medición de pH de las muestras. En el momento que se abrió el CMR se introdujo suficiente muestra en un beaker de 100 mL de vidrio borosilicato para determinar el pH. Se tapó con papel parafilm de laboratorio y se mantuvo a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h. Una vez atemperado, se añadió una pastilla de agitación, se agitó constantemente y se introdujo el electrodo de vidrio con termómetro digital acoplado. Se anotó el dato de pH obtenido para la muestra considerando el tiempo de estabilización calculado anteriormente. Se realizó la determinación por triplicado, en unidades de mV y en escala de pH.

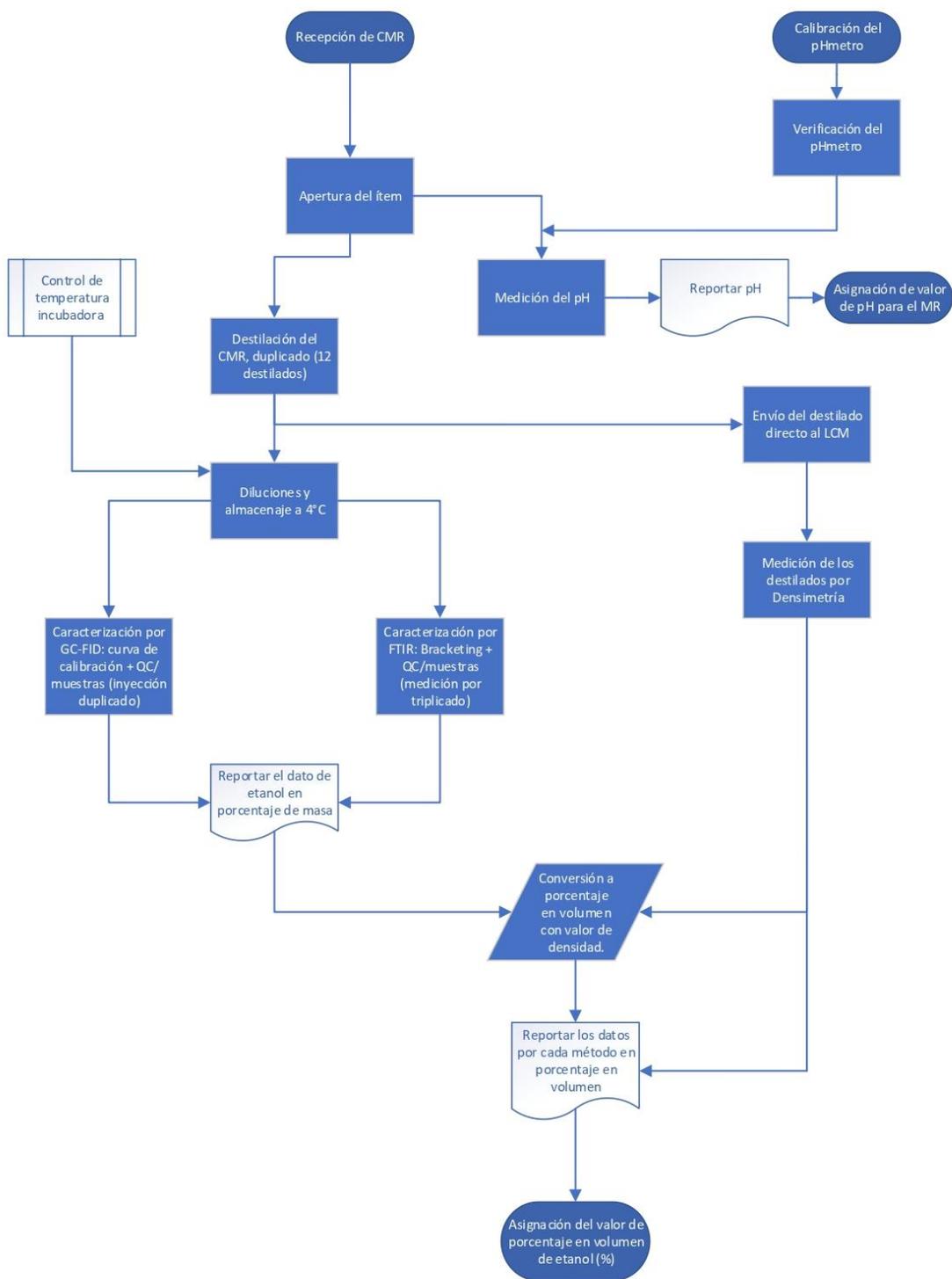


Figura 26: Diagrama de flujo que sintetiza el proceso de caracterización de contenido de etanol por diferentes metodologías y de pH. Elaboración propia.

3.5 Estudios de Homogeneidad

Los estudios de homogeneidad del CMR fueron llevados a cabo en el Departamento de Metrología Química del LCM (DMQ), utilizando la metodología de determinación de densidad con un densímetro de oscilación armónica marca Anton Paar, modelo: DMA 5000, número de serie: 80560838.

Para la determinación de homogeneidad entre botellas, se utilizaron 12 muestras del lote. Cada muestra se destiló según el procedimiento descrito **en la sección "Preparación de muestra" de la sección "3.4 Caracterización del CMR."** Las unidades muestreadas se separaron en dos tractos: el primer tracto **consiste en la destilación de los ítems impares (H1, H3, H5..., H11) en orden numérico creciente. Posteriormente, se realiza la destilación de los ítems pares (H2, H4, ..., H12) en orden numérico creciente.** Eso completaría la primera réplica de los doce ítems. El segundo tracto consiste en la destilación de los ítems impares, pero iniciando del ítem codificado mayor (H11) en orden numérico decreciente. Similarmente, con las unidades pares, iniciando desde H12. La lógica detrás de esta secuencia consiste en lograr la diferenciación de tendencias por preparación y medición, la cual se analiza a través de un análisis gráfico de los resultados de concentración obtenidos, contra número de muestra preparada y medida, para plantear una prueba t de significancia en sus pendientes obtenidas y determinar si son estadísticamente iguales a cero. Se espera que haya una distribución aproximadamente normal de los datos con altos niveles de simetría, ya que se desea que las diferencias entre los resultados sean debido a efectos aleatorios que afectan a todos con la misma probabilidad. Según el planteamiento experimental, se tiene un total de 24 destilaciones independientes, medidas por triplicado en el densímetro, para un total de 72 mediciones. Estas muestras fueron identificadas **con la codificación "H#. #", donde "H" corresponde a homogeneidad entre botellas, el primer "#" corresponde a la identificación de la botella, el segundo valor de "#" se refiere a la réplica para esa unidad.** Como ejemplo, la segunda muestra destilada de la botella número 2 se rotuló como "H2.2".

Para el estudio de homogeneidad dentro de la botella, se analizaron cuatro muestras del lote, las cuales se dividieron en tres submuestras por unidad de igual masa. Las unidades muestreadas se destilaron en un orden del G1-G4 en orden numérico creciente. Cada réplica se realiza luego de una serie de mediciones de los 4 ítems. Es decir 1-4 luego 1-4 y finalmente 1-4. Cada submuestra se destiló y se analizó por el método de densimetría por triplicado; para un total de 12 destilaciones y 36 mediciones. Estas muestras fueron identificadas **con la codificación "G#. #", donde "G" corresponde a homogeneidad dentro de la botella, el primer "#" corresponde a la identificación de la botella, el segundo valor de "#" se refiere a la submuestra para esa unidad.** Como ejemplo, la segunda submuestra destilada de la botella número 2 **se rotuló como "G2.2".** El resumen de este proceso se ilustra en la Figura 27.

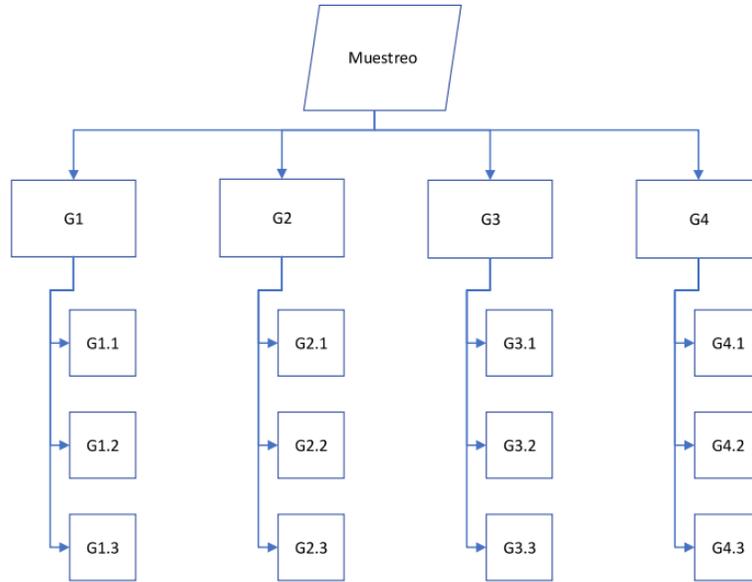


Figura 27: Esquema simplificado de la medición de homogeneidad dentro de botellas, donde se observa el muestreo de cuatro unidades y una separación en tres submuestras por unidad, para medir por triplicado. Elaboración propia.

El análisis estadístico llevado a cabo para la determinación de la homogeneidad del producto (entre y dentro), consiste en el planteamiento de un ANOVA de un factor, para determinar si no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las unidades ensayadas (H_0) o bien, determinar si al menos una unidad analizada presenta diferencias significativas con respecto a las demás (H_a). Este estudio estadístico fue ejecutado por personal experto del LCM.

3.6. Estudios de Estabilidad.

El estudio de estabilidad consistió en un análisis a corto plazo según el esquema isócrono a dos temperaturas: 20 °C y 37 °C, que son respectivamente, una temperatura de referencia donde se espera que no existan cambios de ningún tipo en las muestras y una temperatura para simular condiciones adversas de transporte. En el tiempo cero, ocho muestras se almacenaron a la temperatura de 37 °C. Una semana después se retiraron dos muestras y se almacenaron a 20 °C. La semana dos, se retiraron otras dos y se colocaron en la temperatura de 20 °C. En la tercera semana, se retiraron otras dos y se colocaron en la temperatura de 20 °C. Finalmente, la cuarta semana se retiraron las últimas y se almacenaron a 20°C. Todas se destilaron según se ha descrito y midieron en condiciones de repetibilidad. La cuantificación se realizó por la metodología de densimetría y *GC-FID*. Los estudios se resumen de forma esquemática en la Figura 28. Las muestras fueron agitadas de previo a abrirlas y medidas en un orden de réplica 1 de 1-8 en orden numérico creciente y en la réplica 2 de la 5-8 y luego de la 1-4. El análisis estadístico llevado a cabo para la determinación de la estabilidad del producto, consiste en la graficación del resultado de las unidades en función del tiempo, con el fin de realizar una regresión lineal y determinar si la pendiente obtenida es estadísticamente igual a cero (H_0) o bien, si la pendiente obtenida es estadísticamente diferente de cero (H_a). Este estudio estadístico fue ejecutado por personal experto del LCM.

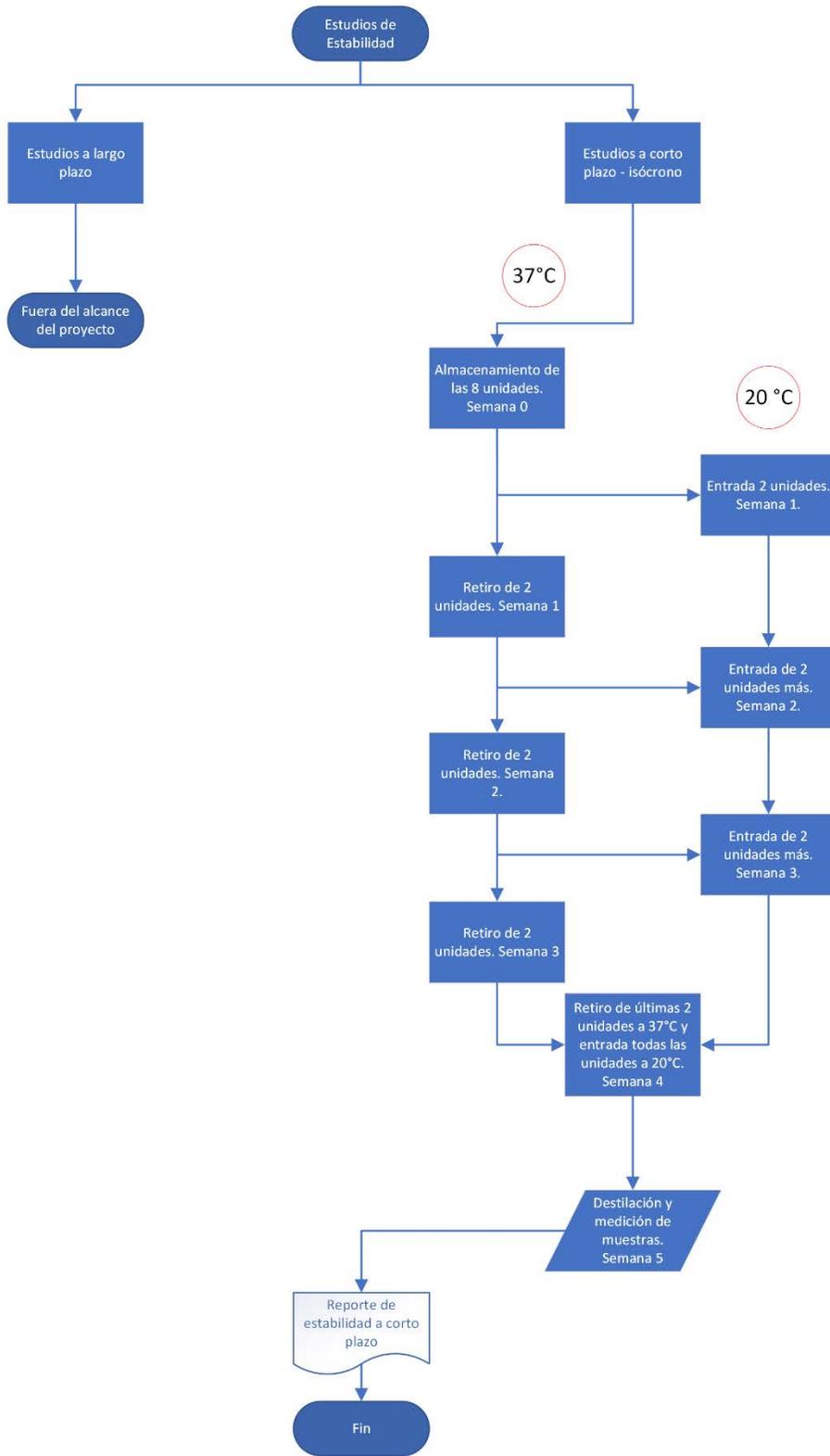


Figura 28: Esquema de los estudios de estabilidad a largo y corto plazo para el CMR de alcohol en gel fabricado. Elaboración propia.

Capítulo 4. Resultados y Discusión.

4.1. Validación de Metodologías.

La validación de metodologías es crucial para la confiabilidad de los resultados obtenidos y también forma parte de requisitos de diversas normas de entes productores de Materiales de Referencia, según la ISO 17034. Por esto, a partir de un método normalizado, se realizó la validación en las técnicas de *GC-FID* y *FTIR-ATR*, las cuales se describen en las secciones siguientes. El método de densimetría ya cuenta con la validación realizada y documentada por parte del LCM, por lo que no se realiza ni discute en este proyecto.

4.1.1. Cromatografía de Gases – *FID*.

El método de cromatografía de gases utiliza una curva de calibración de cinco puntos, con tres patrones adicionales para análisis de repetibilidad y como control de calidad del método; en concentraciones similares al patrón 1, 3 y 5.

Selectividad.

Según el reglamento técnico RTCR 501:2020 que define el uso apropiado de sanitizantes de manos, es posible tener productos con etanol o isopropanol únicamente como ingrediente activo o bien, mezclas de ambos dentro de la misma fórmula⁷. En este sentido, es importante conocer si el método es selectivo para etanol o si es capaz de cuantificar ambos alcoholes formando una mezcla etanol-IPA-agua. Los resultados para evaluar la selectividad se muestran en el Cuadro VIII y la Figura 29 a continuación.

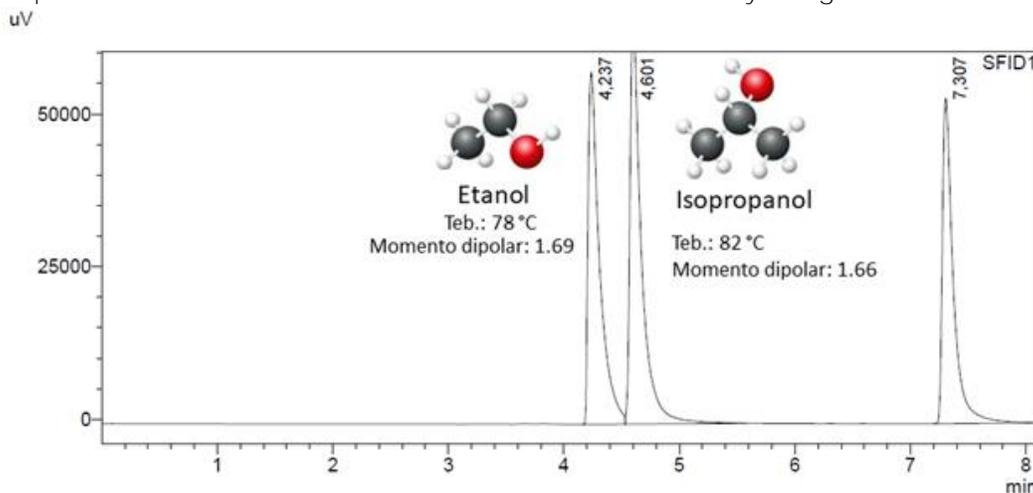


Figura 29: Picos de etanol (tiempo de retención: 4.237 min) e isopropanol (tiempo de retención: 4.601 min) mostrando traslape en los puntos finales del pico de isopropanol, afectando una cuantificación múltiple de los alcoholes.

Como se observa, el etanol tiene un tiempo de retención de 4.237 min contra 4.601 min del isopropanol, que incluso muestran un traslape en la parte final del etanol e inicial del IPA. Es decir, las condiciones operativas definidas no son aptas para la cuantificación múltiple de los alcoholes. Modificando las condiciones operativas del equipo: en la temperatura del horno, puerto de inyección y presión en la columna; tampoco se obtuvo una separación de estos alcoholes. Esto se puede explicar y entender desde su estructura química y desde la columna utilizada. Primeramente, la estructura química de ambos alcoholes

es muy similar, al igual que su temperatura de ebullición y polaridad (momento dipolar etanol: 1.69; momento dipolar isopropanol: 1.66). Estas dos son propiedades fisicoquímicas que modulan la interacción con la fase estacionaria y, segundo, al ser una columna no polar (SP-Sil 5CB) la interacción requiere que las diferencias en polaridad sean más marcadas para tener tiempos de retención diferentes.

De esto se concluye que la fase estacionaria utilizada no es apropiada para la cuantificación de ambos alcoholes simultáneamente y por lo tanto para mezclas etanol-isopropanol en fórmulas de alcohol en gel. A modo de recomendación y considerando que las mezclas de etanol e isopropanol están permitidas según reglamento, es ideal considerar el uso de una columna polar o medianamente polar, como por ejemplo una Porapak-S, ya que podría proporcionar una mejor resolución y separación de picos etanol-isopropanol; facilitando la cuantificación simultánea de los alcoholes. La columna utilizada (SP-Sil 5CB) no es apropiada para la determinación simultánea de etanol e isopropanol, pero sí lo es para la cuantificación de mezclas etanol-agua.

El estándar interno corresponde al 1-butanol. Este se añade de forma equitativa en todos los patrones y muestras para corregir el error de inyección manual. Como se observa en la Figura 29, utilizando los parámetros operativos definidos en el Cuadro III, el etanol y el 1-butanol tienen tiempos de retención diferentes (4.237 contra 7.607 del 1-butanol), sin mostrar ningún traslape.

Al obtener una diferencia entre ambos picos de más de 3 minutos, con buena resolución y con una desviación estándar de sus tiempos de retención menor a 0.1 minutos; se concluye que el estándar interno de 1-butanol es apropiado para esta cuantificación.

Cuadro VIII: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de selectividad, *GC-FID*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Selectividad	Etanol y 1-butanol presenten tiempos de retención diferentes	Hay una diferencia de más de tres minutos entre sí, mostrando mínimas probabilidades de traslape. Además, presentan buena resolución.	Es adecuado para el uso previsto.
	El método sea selectivo para etanol en formulaciones etanol-agua o etanol-IPA-agua	El método, con las condiciones operativas establecidas, presenta traslapes en los picos de etanol e isopropanol	Es adecuado para el uso previsto, siempre y cuando la formulación no posea una mezcla de etanol e IPA.

Linealidad

La linealidad se analizó mediante una curva de calibración de cuatro puntos, inyectados por cuadruplicado de concentraciones de 0.36 % hasta 2.66 % (fracción en masa expresado como porcentaje).

Los patrones y la disolución madre tienen las concentraciones a como se detalla en el 1 de la sección de anexos. Los patrones se inyectan en el cromatógrafo según los parámetros operativos del Cuadro III, para obtener una curva de calibración mostrada en la Figura 30. Los datos obtenidos por el equipo, se detallan en el Cuadro A 2 de la sección de Anexos. Este modelo tiene un coeficiente de Pearson de 0.9999, indicando una perfecta correlación entre la concentración de los patrones y señal del equipo para el ámbito de trabajo seleccionado. Para determinar si el modelo matemático utilizado para la regresión es de mínimos cuadrados ordinarios (OLS) o ponderados (WLS), se realizó una prueba de Bartlett, según recomendación experta del LCM. Esta prueba estadística se aplica para determinar si la población analizada tiene la misma varianza (modelo homoscedástico). Al aplicar la prueba a los datos obtenidos en el Cuadro A 2, se obtiene un valor estimado de T menor (7.25) al estadístico χ^2 (7.81) al 95% de confianza, determinando que el modelo apropiado a utilizar corresponde de mínimos cuadrados ordinarios (OLS), es decir, se presenta un modelo homoscedástico. Esto es beneficioso porque al ser un modelo predictivo, las varianzas similares entre puntos aumentan la exactitud en todo el alcance de la regresión. Los resultados resumidos para este parámetro de validación se detallan en el

Cuadro IX.

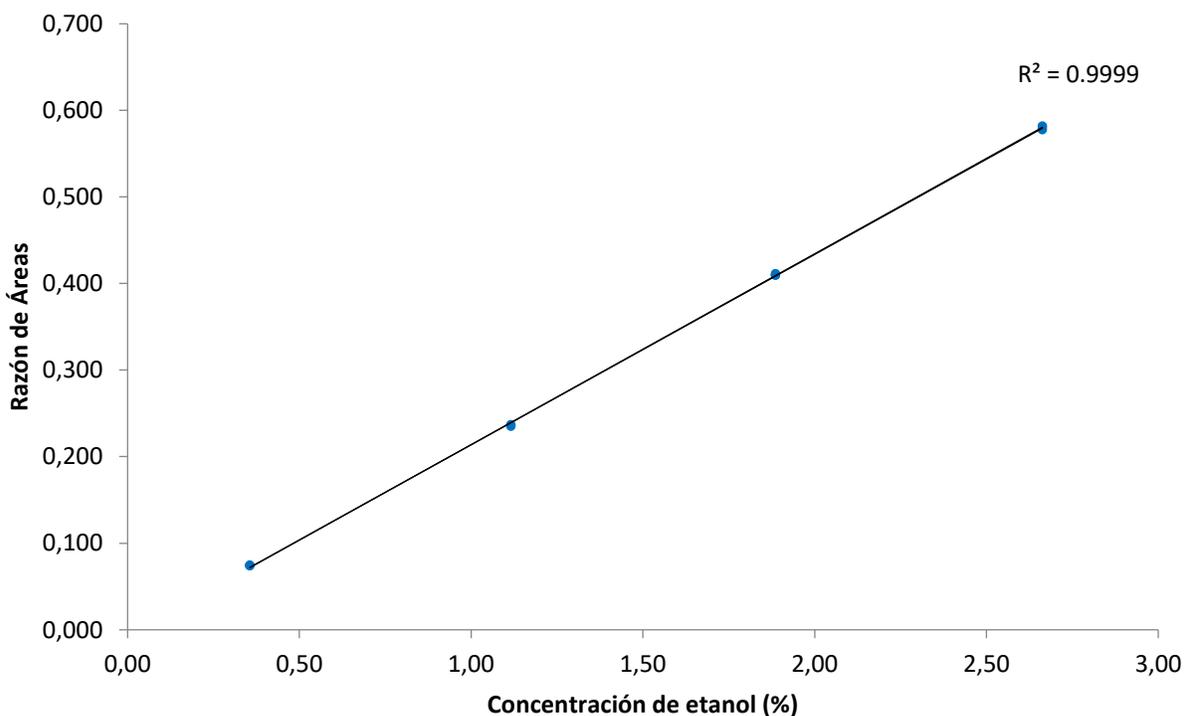


Figura 30: Curva de calibración obtenida a partir de cuatro estándares de concentración conocida como variable independiente y la razón de áreas entre el analito y el estándar interno, como variable dependiente para el método de cuantificación de etanol por *GC-FID*.

Cuadro IX: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de linealidad, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Linealidad	Coficiente de Pearson >0.995	0.9999	Es adecuado para el uso previsto.
	Definición del modelo a utilizar	Modelo OLS, varianzas iguales (homoscedástico)	Es adecuado para el uso previsto.

Límites de Cuantificación y Límites de Detección.

Para calcular los límites de detección y cuantificación, se considera la desviación estándar de una cantidad considerable de réplicas de los patrones inyectados en el equipo y se calculan según la LD y la LC . Se realiza de esta manera ya que no hay un blanco que se utilizará como corrección de rutina. Los datos para el cálculo del estadístico $S_{y/x}$ se muestran en el Cuadro A 2.

$$LD = 3 \cdot \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$LC = 10 \cdot \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{Ecuación 13}$$

Los resultados obtenidos se sintetizan en el Cuadro X a continuación.

Cuadro X: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de LC y LD, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Límites de cuantificación y detección	Que los valores de LD y LC sean menores que el patrón de menor concentración de la regresión.	LC: 0.03 % LD: 0.10 %	Al tener un valor menor al patrón de menor concentración (0.36 %), se consideran adecuados para el uso previsto.

Veracidad.

El cálculo de la veracidad se estima mediante un sesgo, que corresponde a la diferencia entre la media de un número suficiente de resultados obtenidos con el método y un valor de referencia; para ello, se utiliza un MRC con un valor de cantidad de etanol de $(95.6 \pm 1.9) \%$ (fracción en masa), se diluye y obtiene un valor intermedio del ámbito de la curva de calibración, denominado R2, detallado en el Cuadro

A 3 (anexos). Se realizan las mediciones, según condiciones operativas del Cuadro III y con base en la , se calcula un sesgo relativo/porcentual, directamente relacionado a la exactitud del método, detallados en el Cuadro XI. Los resultados de las inyecciones en el equipo, se muestran en el Cuadro A 4 (anexos). El Cuadro XII muestra los resultados finales con la conclusión según el criterio de aceptación definido.

$$b (\%) = \frac{\bar{X}-X_{ref}}{X_{ref}} * 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

Cuadro XI: Resultados obtenidos del equipo GC-FID para la determinación del sesgo contra el MRC en etanol.

Valor obtenido (%)	Valor de referencia (%)	Sesgo (%)	Sesgo (%)
97,29	95,60	1,69	1,76

Cuadro XII: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de veracidad, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Veracidad	Cálculo del sesgo, sesgo no mayor a 3 % (valor absoluto).	b = 1.76 %	Se considera una exactitud adecuada para su uso previsto.

Precisión como precisión intermedia.

Para el análisis de una precisión intermedia, se realizó una serie de ocho mediciones de un patrón intermedio a la curva de calibración en condiciones de repetibilidad, pero con el factor día: mismo analista, mismo equipo, pero en tres días distintos (analiza factor día, periodos largos de tiempo) donde el Cuadro A 5 (anexos) se refiere a una medición en el mes de marzo y las siguientes dos, abril y mayo. El análisis propuesto consiste en un ANOVA de un factor, donde se analiza la variabilidad entre grupos y dentro de grupos para definir el valor de repetibilidad dentro de grupos y precisión intermedia relativa porcentual. Los resultados se adjuntan en el Cuadro A 6 y Cuadro A 7 presentados en anexos.

Para el análisis de precisión intermedia, se considera la desviación estándar intermedia (s_L), que corresponde a la diferencia absoluta entre la desviación estándar promedio dentro (s_b^2) y entre de grupos (s_d^2), dividido por la cantidad de réplicas (n) por día ().

$$s_L^2 = \frac{|s_d^2 - s_b^2|}{n} \quad \text{Ecuación 15}$$

La que se refiere a la repetibilidad dentro de grupos (DSRr%), se expresa como una desviación estándar promedio relativa porcentual, dividiendo la desviación estándar promedio (S_b promedio) dentro de grupos entre el promedio global:

$$DSRr (\%) = \frac{\sqrt{s_b^2}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 16}$$

Finalmente, la precisión intermedia (DSRR%) estima el aporte de la precisión con el factor día, considerando tanto el aporte dentro y entre grupos. Se obtiene con el cociente de la suma de s_L con s_b (promedio) con el promedio global (\bar{x}).

$$DSRR (\%) = \frac{\sqrt{s_L^2 + s_b^2}}{\bar{x}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Los resultados se detallan en el Cuadro XIII.

Cuadro XIII: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de precisión, para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Precisión (en términos de repetibilidad y precisión intermedia)	- DSRr% menor a 0.5 % - DSRR% menor a 1.9 %	- DSRr% = 0.45 % - DSRR% = 0.46 %	Se considera una precisión adecuada para su uso previsto, a través del análisis de repetibilidad dentro de grupos y precisión intermedia.

Incertidumbre.

La propagación de la incertidumbre se incluye como parámetro de desempeño puesto que es determinante para la calidad del resultado final. Para cuantificar todos los aportes que tienen incidencia en el resultado final, se debe establecer la , como la ecuación para determinación de concentración como fracción en masa.

$$Cn (\text{en masa}) = a \cdot \frac{Masa_{líquida}}{Masa_{etOH}} \cdot \frac{Masa_{aforada}}{Masa_{inicial}} \cdot s \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde:

- "a" se refiere a la concentración diluida de la interpolación de la curva de calibración, en porcentaje (fracción en masa).
- "Masa_{líquida}" se refiere a la masa líquida de la dilución, en gramos.
- "Masa_{etOH}" se refiere a la masa líquida de destilado agregado, en gramos.
- "Masa_{aforada}" se refiere a la masa líquida del balón aforado de 100.00 mL colector de la destilación, en gramos.
- "Masa_{inicial}" se refiere a la masa de muestra inicial medida antes de destilar, en gramos.
- "s" se refiere a la repetibilidad, con un valor de 1, ya que no influye en el resultado para la determinación de concentración, pero sí es un aporte de relevancia para incertidumbre.

A partir de esto, se puede elucidar con un diagrama de Ishikawa (Figura 37) donde cada aporte tiene desglosado todos sus componentes. Es de considerar el aporte de la repetibilidad (μ_{rep}) dentro de la incertidumbre, la cual se calcula como el **cociente de la desviación estándar entre la raíz cuadrada de "n"**

réplicas. La combinación de los aportes, se lleva a cabo según lo establecido en la guía para expresión de incertidumbre de la GUM³⁸, como se observa en el Cuadro X/V. Los cálculos para cada aporte se observan en el Cuadro A 11, Cuadro A 12, Cuadro A 13 y Cuadro A 14 de la sección de anexos.

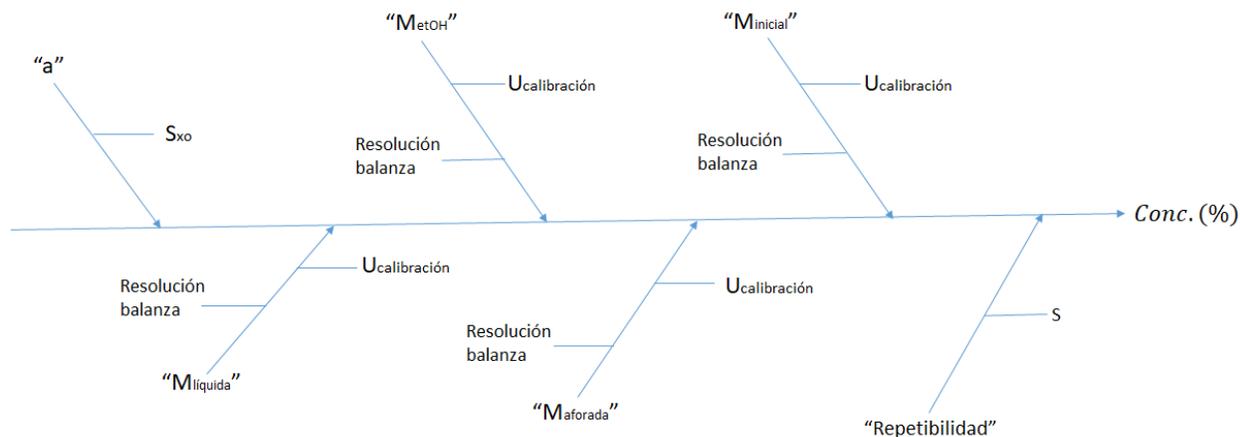


Figura 31: Diagrama de Ishikawa como representación gráfica de los aportes a la incertidumbre que tiene el proceso de medición. Elaboración propia.

Cuadro XIV: Resultados de la incertidumbre estándar de cada aporte, incertidumbre combinada y expandida ($k=2$). Unidades en fracción en masa expresada como porcentaje. Para el método de cuantificación de etanol por *GC-FID*.

Descripción	Incertidumbre estándar	Incertidumbre combinada (%) [*]	Incertidumbre Expandida (\pm , %) [*]
μ repetibilidad	0.4491	1.05	2.1
μ dilución gravimétrica 1	0.0002		
μ dilución gravimétrica 2	0.0002		
μ regresión	0.9501		

*Las unidades corresponden a fracción en masa expresadas como porcentaje.

Cuadro XV: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de incertidumbre, *GC-FID*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Incertidumbre	Incertidumbre no mayor a ± 3.0 % porcentaje en masa expresada como porcentaje, con un factor $k=2$ para un 95 % de cobertura, basado en una distribución normal.	Incertidumbre expandida con $k=2$, de ± 2 %	Se considera una incertidumbre adecuada para su uso previsto.

Declaración de cumplimiento.

Se concluye que el método utilizado para cuantificación etanol en mezclas binarias etanol-agua, utilizando cromatografía de gases-*FID*, es apto para su uso previsto, a partir de los resultados conformes de los parámetros de desempeño.

4.1.2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier.

El método de FTIR a utilizar seguirá un método de calibración denominado *bracketing*. Este procedimiento consiste en una curva de calibración únicamente compuesta por dos patrones. Cuando un instrumento presenta una señal de fondo que evita que el intercepto de la curva de calibración sea cero, es recomendable utilizar el bracketing ya que reduce el sesgo de la calibración⁷⁰. En el caso del FTIR, es un equipo que requiere una constante repetición del "cero" para eliminar el ruido, por lo que se optó por cuantificar mediante esta técnica. Adicionalmente, al tener una concentración constante en todos los ítems del CMR ya que el lote será, en teoría, homogéneo, no se requiere un ámbito amplio para muestras de distinta concentración. **La técnica consiste en determinar una "k" experimental**, que corresponde al inverso de la sensibilidad, definida según la , para luego utilizarla en la , y determinar el valor de una muestra de concentración intermedia entre los dos patrones.

$$\hat{k} = \frac{F_2 - F_1}{Abs_2 - Abs_1} \quad \text{Ecuación 19}$$

Dónde: F_1 corresponde a la concentración del patrón menos concentrado, F_2 corresponde a la concentración del patrón más concentrado, Abs_1 corresponde a la absorbancia del patrón F_1 y Abs_2 corresponde a la absorbancia del patrón F_2 .

$$Cn_x = \hat{k} \cdot (Abs_{obtenida} - Abs_1) + F_1 \quad \text{Ecuación 20}$$

Dónde: Cn_x corresponde a la concentración de la muestra y $Ab_{Sobtenida}$ corresponde a la absorbancia de la muestra.

Gráficamente en Figura 32, se puede observar el ámbito que cubren las ecuaciones anteriores, para la cuantificación de las muestras.

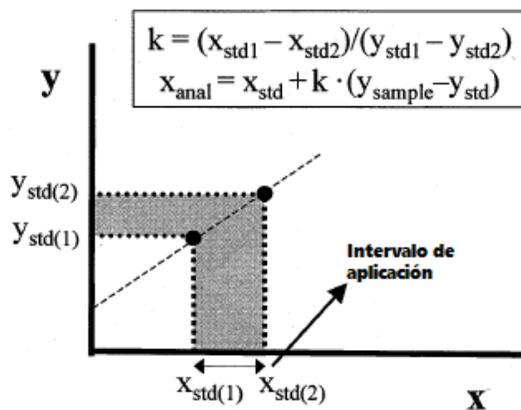


Figura 32: Representación gráfica de una curva de bracketing, mostrando el intervalo de aplicación definido por los dos patrones utilizados. Tomado de Cuadros, L. (2001)⁷¹.

Selectividad.

Similar al método de *GC-FID*, es importante conocer si el método es selectivo, en el caso concreto de este proyecto, los patrones y muestras se enfocarán en mezclas etanol-agua; ya que si el método de

GC-FID tiene la limitante (con la columna utilizada) de cuantificar ambos alcoholes, el método de *FTIR* debe alinearse a esto. Sin embargo, se probó también si es posible cuantificar etanol e isopropanol, ya que hay formulaciones que contienen mezclas.

El pico de absorbancia de interés para ambos alcoholes corresponde al estiramiento C-O, que, en el caso de bases de datos de los alcoholes, mostrados en la Figura 33 A y B, ronda en 1044 cm^{-1} para etanol y 1175 cm^{-1} para isopropanol (IPA).

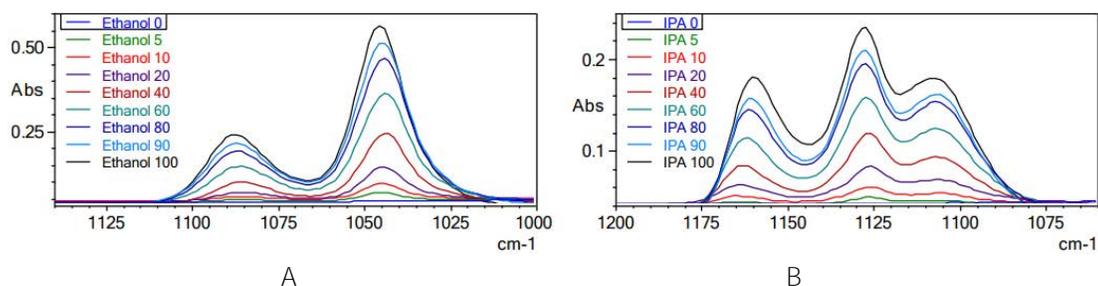


Figura 33: Señales obtenidas de etanol (A) e IPA (B) en el ámbito de las señales de interés para la cuantificación. Tomado de Shimatzu (2020)⁷².

Basándose en las diferencias entre los picos de interés para la determinación, es posible cuantificar ambos alcoholes en una sola muestra, a diferencia del *GC-FID*. No obstante, para formulaciones con aditivos como glicerina (el cual es sumamente común por su efecto hidratante en las manos) u otros similares con enlaces C-O, se ha encontrado que hay interferencias con el pico de interés de etanol en 1044 cm^{-1} y por lo tanto la determinación directa del gel con un acoplamiento ATR puede generar errores en su cálculo⁷³. Se recomienda siempre realizar el paso de destilar la muestra de alcohol en gel, para eliminar este tipo de interferencias.

Como confirmación adicional de la selectividad del equipo frente al analito (etanol), se analiza una muestra de etanol absoluto con las condiciones operativas definidas en el *Cuadro IV*, de manera que se determine su nivel de similitud con las bases de datos oficiales de Shimatzu para el compuesto puro. El resultado obtenido se detalla en la Figura 34.

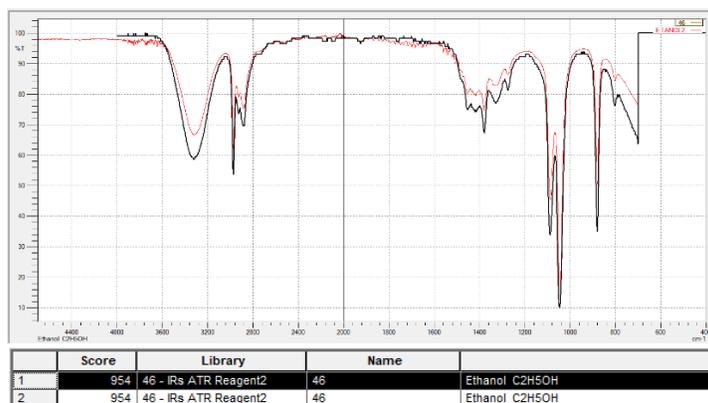


Figura 34: Espectro infrarrojo obtenido de la muestra de etanol absoluto (rojo), comparado con el espectro infrarrojo de la base de datos de Shimatzu (negro). Se obtiene una similitud de 95.4 % con ambos espectros.

Se concluye que el equipo logra determinar con una alta eficiencia (95.4 %) el etanol con el acoplamiento ATR y por lo tanto es apropiado para el uso previsto.

Cuadro XVI: Resumen de resultados y criterio de aceptación para el parámetro de validación de selectividad, para el método de cuantificación de etanol por *FTIR*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Selectividad	<ul style="list-style-type: none"> - Que el espectro obtenido para etanol coincida en no menos de 95% con las bases de datos reportadas para etanol absoluto. - Que se determine si el etanol y el IPA pueden ser determinados de forma independiente en una sola medición. 	<ul style="list-style-type: none"> - Espectro coincide en 95.4 % con las bases de datos, para un patrón de concentración intermedia. - El método (con destilación) no es específico para etanol y se puede cuantificar ambos alcoholes en una medición sin interferencias. 	El parámetro de selectividad es apropiado para el uso previsto.

Veracidad

Se determinó la veracidad del método mediante la determinación del valor de un patrón preparado a través del MRC en etanol, de concentración intermedia entre ambos puntos de la curva de bracketing. La veracidad del método se expresa mediante un sesgo que se estima en términos del error relativo, según la Ecuación 14. Los resultados obtenidos se sintetizan en el Cuadro XVII.

Cuadro XVII: Resultados obtenidos del equipo *FTIR-ATR* para la determinación del sesgo contra el MRC en etanol.

Valor obtenido (%) [*]	Valor de referencia (%) [*]	Sesgo (%) [*]	Sesgo porcentual (%)
91.25	95.60	4.35	4.55

^{*}Unidades de fracción en masa expresada como porcentaje.

Al obtener resultados superiores a la tolerancia establecida para este rubro, se considera que el método no cumple para su uso previsto en términos de veracidad. A modo de prueba alternativa y, como el *QC* utilizado se preparó algunos días antes de las mediciones, se toma un vial de disolución madre almacenado a 4 °C y se prepara un *QC* el mismo día de las mediciones. Los resultados muestran datos favorables del sesgo. Por esta razón, se sospecha una posible pérdida del analito en el *QC* y se recomienda preparar las soluciones y los estándares lo más cercano a la fecha de medición, y garantizar el correcto almacenaje a baja temperatura para minimizar los efectos de la posible fuga del etanol. Los resultados del análisis del sesgo en una segunda medición, se observan en el *Cuadro XIX*. Los datos obtenidos del equipo para estas mediciones se detallan en el Cuadro A 15 y Cuadro A 16 de la sección de Anexos. A pesar de ser apropiado para el uso previsto, no siempre es posible preparar estándares el mismo día por la disponibilidad de los estándares y la forma de trabajo de los laboratorios, por lo que los datos apropiados para analizar este parámetro de validación corresponden a los del Cuadro XVIII.

En la literatura, se detalla que para matrices similares a la descrita en este trabajo, el método de determinación del contenido alcohólico por *FTIR-ATR* es apropiado para el uso previsto, e incluso es

comparable analíticamente con el método por *GC-FID*⁷³. Una explicación para la discrepancia con los datos obtenidos en esta validación, puede atribuirse a un error sistemático que se repitió en las mediciones, al no haberse establecido una línea base completamente horizontal antes de determinar la altura (absorbancia) del pico de interés para etanol. Considerando que, pequeñas variaciones de absorbancia (incluso en el tercer decimal) generan grandes cambios en el resultado final, este error pudo generar el sesgo elevado, ya que los datos del mismo QC medido de forma repetida parecen mostrar buena precisión (variaciones de las absorbancias son de ± 0.001 , es decir, la resolución del equipo).

Otro hallazgo relevante, es que se observó que el equipo *FTIR* suele presentar valores de sesgo promedio apropiados, no obstante, variaciones mínimas de la absorbancia obtenida de la muestra, genera grandes cambios en los resultados finales y, por lo tanto, en el sesgo obtenido. Esto se observa al determinar un sesgo promedio apropiado de 0.605 % pero acompañado de una desviación estándar de 1.56 %. Por esta razón, se recomiendan ciertos puntos importantes para garantizar la veracidad de las mediciones:

1. El QC debe, preferiblemente, prepararse y medirse en el tiempo de una semana, a pesar de estar almacenado a 4 °C.
2. Cada medición de QC debe ser medida no menos de cuatro veces.
3. Mantener el sistema controlado con los QC cada 4 muestras.
4. Medir la misma muestra (en etapas de caracterización y estabilidad) no menos de 6 veces.
5. **Realizar una medición de "fondo" (*background*)** entre cada muestra o QC.

Cuadro XVIII: Resultados obtenidos para el parámetro de desempeño de sesgo, con el primer QC medido, para la validación del método por *FTIR-ATR*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Veracidad	- Sesgo relativo (b) no mayor a 3%	- b = 4.55 %	Se considera una exactitud no apropiada para su uso previsto. Se debe aplicar un factor de corrección a los resultados finales, derivado del sesgo promedio obtenido.

Cuadro XIX: Resultados obtenidos para el parámetro de desempeño de sesgo, con el segundo QC medido, para la validación del método por *FTIR-ATR*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Veracidad	- Sesgo relativo (b) no mayor a 3%	- b = 0.605 %	Se considera una exactitud apropiada para su uso previsto.

Precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

Para el análisis de una precisión intermedia, se realizó una serie de ocho mediciones de un patrón intermedio a la graficación de bracketing en condiciones de repetibilidad, pero con el factor día: mismo analista, mismo equipo, pero en tres días distintos (analiza factor día, periodos largos de tiempo) donde el Cuadro A 17 (anexos) se refiere a una medición en el mes de marzo y las siguientes dos, abril y mayo. El análisis propuesto consiste en un ANOVA de un factor, donde se analiza la variabilidad entre grupos y dentro de grupos para definir el valor de repetibilidad dentro de grupos y precisión intermedia relativa porcentual. Los resultados se adjuntan en el Cuadro A 18 y Cuadro A 19 presentados en anexos.

Para el análisis de precisión intermedia, se consideran la desviación estándar intermedia (s_L), la repetibilidad entre grupos (DSRr%) y la precisión intermedia (DSRR%); según , y , obteniendo los resultados expresados en el Cuadro XX.

Cuadro XX: Resumen de resultados obtenidos para el parámetro de validación de precisión. Para el método de cuantificación de etanol por *FTIR-ATR*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Precisión (en términos de repetibilidad y precisión intermedia)	- DSRr% menor a 0.50 % - DSRR% menor a 1.90 %	- DSRr% = 1.11 % - DSRR% = 1.39 %	Se considera una precisión no apropiada para su uso previsto, para el estudio de repetibilidad entre grupos. El valor de repetibilidad intermedia sí se considera apropiado para su uso previsto.

Incertidumbre.

La propagación de la incertidumbre se realiza a partir de la , en fracción en masa expresada como porcentaje, cuyo diagrama de Ishikawa se detalla en la Figura 35. La combinación de los aportes, se lleva a cabo según lo establecido en la guía para expresión de incertidumbre de la GUM. Los resultados se resumen en el Cuadro XXI y Cuadro XXII. Los resultados desglosados para esta propagación de

incertidumbre se observan en el Cuadro A 23, Cuadro A 24, Cuadro A 25, Cuadro A 26, Cuadro A 27, Cuadro A 28 y Cuadro A 29 (anexos).

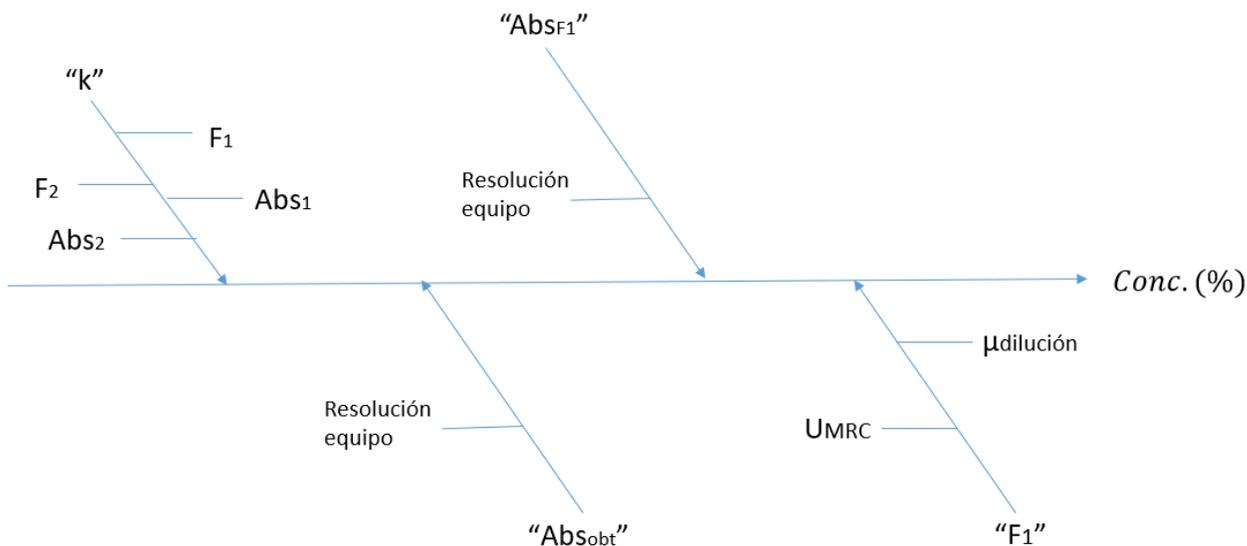


Figura 35: Diagrama de Ishikawa como representación gráfica de los aportes a la incertidumbre que tiene el proceso de medición. Elaboración propia.

Cuadro XXI: Resumen de los valores de la incertidumbre estándar de cada aporte, incertidumbre combinada y expandida ($k=2$). Unidades en fracción en masa expresada como porcentaje. Para el método de cuantificación de etanol por *FTIR*.

Descripción	Incertidumbre estándar	Incertidumbre combinada (%) [*]	Incertidumbre Expandida (\pm , %) [*]
$\mu \kappa$	0.00370	1.62	3.2
μAbs_{F1}	0.00007		
$\mu \text{Abs}_{\text{Sob}}$	0.00007		
μF_1	0.01737		

*Estas unidades son de porcentaje en masa expresada como porcentaje.

Cuadro XXII: Resumen de resultados obtenidos para el parámetro de validación de incertidumbre. Para el método de cuantificación de etanol por *FTIR*.

Parámetro a validar	Criterios de aceptación	Resultado obtenido	Conclusión
Incertidumbre	Incertidumbre no mayor a 3.0 % porcentaje en masa expresada como porcentaje, con un factor $k=2$ para un 95 % de cobertura, basado en una distribución normal.	Incertidumbre expandida: ± 3.2 % con un factor $k=2$ para un 95 % de cobertura, basado en una distribución normal.	No se considera una incertidumbre adecuada para su uso previsto.

Declaración de cumplimiento.

Se concluye que el método utilizado para cuantificación etanol en mezclas binarias etanol-agua, utilizando *FTIR*, no es apto para su uso previsto, ya que no cumple los criterios de aceptación descritos de incertidumbre, veracidad y precisión; considerados parámetros de suma relevancia para la confiabilidad de los resultados. En caso de utilizarse por necesidad del laboratorio, se recomienda seguir las recomendaciones descritas en la **sección de "veracidad" y aumentar la cantidad de réplicas de manera que se compense el efecto de la imprecisión del método.**

4.2. Producción del Candidato a Material de Referencia.

Una vez que el proceso productivo del material culmina, se inicia con el envasado y empaque. Se obtuvo un total de 44 cajas, es decir, 528 unidades, en una producción formulada y preparada para 50 galones de muestra, según estipuló la APP. Se utilizó un envase de PET opaco ya que es un material reconocido para disminuir la transpiración de materiales volátiles, reduce el riesgo de degradación por luz solar, permite el uso de liner inductivo y abarca un volumen apropiado para tener suficientes unidades al mismo tiempo que brinda oportunidad de realizar diversas réplicas. Las 44 cajas se trasladaron el día martes 25 de enero del 2022 a las instalaciones del LCM donde permanecen en la bodega de materias de referencia (Figura 36 b) ubicado en el segundo piso del DMQ, en condiciones controladas de temperatura (23 ± 5) °C, mientras concluyen los estudios de caracterización, homogeneidad y estabilidad. Los resultados del control de calidad se observan en el Cuadro XXIII.

Cuadro XXIII: Resultados de control de calidad, obligatorios para liberación del producto y proceder con envasado*.

Análisis de calidad	Resultado	Criterio	Unidades
Apariencia en líquido	Aprobado	Comparación física contra estándar, no hay diferencias visuales de color	N.A.
Apariencia en vidrio	Aprobado	Aplicación en vidrio, observación de grumos	N.A.
pH*	7.40	6.50 a 7.50	N.A.
Viscosidad rotacional	3640	3000 a 5000	cP
Peso por galón de muestra líquida	3.31	3.26 a 3.40	kg/gal

*Estos datos fueron sustraídos de los resultados de control de calidad de Sur Química, para este lote en específico. Es importante aclarar que estos resultados no tienen injerencia sobre los valores que se emitirán para el MRC.

Una vez envasado, el producto pasa por una inspección visual aleatoria de los *liner*, para asegurar su sello. Todos los liner se mantienen correctamente adheridos, aunque no deben ser inspeccionados de

forma inmediata puesto que el adhesivo no se ha secado totalmente. El producto final se observa en la Figura 36 a), a continuación.



a)



b)

Figura 36: a) Producto terminado en su envase etiquetado y *liner* inductivo. b) Bodega de almacenamiento de materiales de referencia del DMQ en el LCM, donde permanecen los envases en forma vertical y aislados de luz solar directa.

4.3. Caracterización del contenido de etanol y pH del CMR.

Caracterización del contenido alcohólico del CMR mediante *GC-FID*.

Al obtener resultados apropiados para el uso previsto de la validación de la metodología con *GC-FID* para la determinación del contenido alcohólico del CMR, se hace uso de este método para cuantificar el valor de fracción en masa expresado como porcentaje del etanol. Para ello, el LCM realiza un muestreo aleatorio estratificado de los ítems y hace entrega de las unidades para el análisis descritas en el Cuadro A 30 (anexos).

Para la cuantificación de las muestras, se hizo uso de cinco estándares provenientes del MRC de etanol para esbozar una curva de calibración, inyectada por quintuplicado en cada punto. Esta curva, apreciada en la Figura A 1 (anexos), se inyectó el mismo día que se realizaron las mediciones de las muestras de forma que se tienen condiciones de repetibilidad en las mediciones. Los resultados de la pendiente e intercepto para la interpolación de resultados, corresponde, respectivamente a $(0,21 \pm 0,07)$ y $(0,005 \pm 0,001)$.

A cada botella se le realizó una destilación por duplicado, para un total de 12 destilaciones, 12 diluciones y 36 mediciones en el equipo (inyecciones por triplicado). Los valores de los resultados de las inyecciones, las destilaciones y las diluciones se muestran en el Cuadro A 31, Cuadro A 32 y Cuadro A 33 de la sección de Anexos. El valor de fracción en masa expresada como porcentaje de etanol se detalla en el

Cuadro XXIV.

Cuadro XXIV: Valor de concentración de etanol promedio obtenida para las mediciones expresado como porcentaje fracción en masa para las muestras destiladas de C1-C6 por duplicado, mediante GC-FID.

Concentración (%)	U, k=2 (±, %)	Desviación estándar (%)
61.5	1.4	0.8

Caracterización del contenido alcohólico del CMR mediante densimetría.

Para el estudio de caracterización, se utilizaron los ítems muestreados y mostrados en el Cuadro A 36 (anexos). Estos envases se destilaron y se tomó una porción sin diluir para la medición directa del densímetro digital, almacenados en tubos totalmente cerrados y a baja temperatura (4 °C).

A cada botella se le realizó una destilación por duplicado, para un total de 24 destilaciones y 72 mediciones en el equipo (mediciones por triplicado, reportado el promedio). Los valores de las destilaciones se muestran en el Cuadro A 34 y Cuadro A 35 de la sección de Anexos. Los resultados individuales en el Cuadro A 36 (anexos). El valor de fracción en masa expresada como porcentaje de etanol promedio se detalla en el Cuadro XXV.

Cuadro XXV: Valor de concentración de etanol promedio obtenida para las mediciones expresado como porcentaje fracción en masa para las muestras destiladas de H1-H12 por duplicado, mediante densimetría.

Concentración (%)	U, k=2 (±, %)	Desviación estándar (%)
62.5	1.3	0.6

A partir de los resultados obtenidos, el valor de caracterización para los ítems del CMR por el método de densimetría corresponde a $(62.5 \pm 1.3) \%$ y por *GC-FID* corresponde a $(61.5 \pm 1.4) \%$ con un factor $k=2$ para un 95 % de cobertura y una desviación estándar de 0.65 % y 0.8 %; respectivamente. El valor de incertidumbre no contempla la componente de repetibilidad, ya que este dato será analizado en la componente de incertidumbre por homogeneidad, por tanto, contemplarla en la etapa de caracterización, sería sobreestimar la incertidumbre final. Este dato no es final y absoluto para el valor de etanol en el CMR, ya que se debe combinar el valor obtenido por el método de cromatografía de gases y el obtenido por densimetría. También se debe contemplar la incertidumbre asociada a la homogeneidad y estabilidad del lote (calculados en secciones siguientes) para cumplir con lo establecido en la ISO 35¹⁰.

Caracterización del pH para el CMR.

Para el estudio de caracterización en pH, se utilizaron los ítems que se detallan en el Cuadro A 36 de la sección de anexos. Estos envases se agitaron vigorosamente previo a la medición y se atemperaron a la temperatura de medición de 20 °C por 4 horas. El valor de pH obtenido se detalla en el Cuadro XXVI.

Cuadro XXVI: Valor de pH promedio obtenido para las mediciones para las muestras de H1-H12 por duplicado.

pH	U, k=2 (±, %)	Desviación estándar
7,669	0.025	0.071

A partir de los resultados obtenidos, el valor de caracterización para los ítems del CMR en su valor de pH corresponde a (7.669 ± 0.025) , con un factor de cobertura de $k=2$ para un 95 % de cobertura y una desviación estándar de 0.071. El valor de incertidumbre no contempla la componente de repetibilidad, ya que este dato será analizado en la componente de incertidumbre por homogeneidad, por tanto,

contemplarla en la etapa de caracterización, sería sobreestimar la incertidumbre final. Este dato, específicamente su incertidumbre, no es final y absoluta, ya que se debe combinar la incertidumbre asociada a la homogeneidad y estabilidad del lote (calculados en secciones siguientes) para cumplir con lo establecido en la ISO 35¹⁰.

4.4. Evaluación de homogeneidad del CMR.

El lote del CMR fue fabricado bajo los estándares internos de Sur Química S.A., los cuales incluyen una agitación mecánica a altas revoluciones con un dispersor por veinte minutos. No obstante, al ser una formulación que se compone de distintos componentes líquidos y sólidos, el riesgo de heterogeneidad en el lote es alto, ya sea por mala integración de los componentes o tamaños de partícula desiguales, y debe ser reducido o mitigado desde la preparación en la tina. Por esta razón, se incluye una agitación adicional a la estándar de 2 horas con un dispersor de aspas y la tina totalmente tapada de manera que haya una pérdida mínima de componentes volátiles. Un material de referencia se considera homogéneo con respecto a una característica dada, si no existen diferencias entre los valores de esta característica en una de sus partes y en otra²⁶. A nivel práctico, se podría alegar homogeneidad en el lote si la diferencia entre los valores de una característica en una parte y en otra es despreciable al ser comparada con la componente de incertidumbre debida a, por ejemplo, la caracterización²⁶.

Para evaluar este componente de la incertidumbre, se realiza un estudio de homogeneidad entre botellas y homogeneidad dentro de las botellas. Para el estudio entre botellas, se realiza un muestreo aleatorio estratificado de doce ítems de diferentes partes del envasado y pretende analizar la homogeneidad del lote como totalidad. Para esto, se calcula un ANOVA de un factor, donde se debe enfocar en el factor "entre grupos", es decir la varianza entre unidades. Con una cantidad alta de unidades por estudio, se tiene mayor resolución de la varianza entre las muestras. Por otro lado, el análisis dentro de botellas pretende estudiar la homogeneidad en una misma botella, sin agitación. Este último podría evidenciar si es necesaria una agitación previa a medir y si el material posee algún tipo de sedimentación que indique que la formulación no es homogénea. El estudio dentro de botellas idealmente se plantea en una única unidad, divida por submuestras y medir cada submuestra con una serie de réplicas. El beneficio de este **planteamiento consiste en que el factor "entre muestras" del ANOVA, será enfocado en las** submuestras, es decir, en la varianza dentro de la unidad muestreada. No obstante, esto no es posible por la naturaleza del CMR en cuestión y las indicaciones del método de análisis. Por lo tanto, se plantea un estudio similar al **explicado "entre botellas", con la salvedad que hay menos unidades y más réplicas (4 botellas, 3 réplicas por cada botella) y el ANOVA se enfocará en el segundo nivel, es decir "dentro de muestras", con una** mejor resolución de la varianza dentro de la unidad. El único inconveniente es que esta determinación de **incertidumbre no será "pura", es decir está "contaminada" con la repetibilidad del método, lo que** aumenta ligeramente el dato de incertidumbre reportado.

Los resultados finales reportados utilizados para estos estudios, se detallan en el Google Drive: <https://drive.google.com/drive/folders/1leg3KVeTmoJHC6ArH6zPs-la2YW69f7z>, dentro de la subcarpeta **"Excel con datos procesados finales" llamados:** Homogeneidad_EtOH_dentro_botellas_densimetria, Homogeneidad_EtOH_entre_botellas_densimetria, Homogeneidad_pH_entre_botellas y Homogeneidad_pH_dentro_botellas.

Los informes asociados emitidos por el LCM con los resultados aquí presentes, los estudios y las conclusiones finales para cada etapa descrita en las secciones siguientes, se encuentran en el Google Drive: <https://drive.google.com/drive/folders/1leg3KVeTmoJHC6ArH6zPs-la2YW69f7z>, dentro de la subcarpeta

“Informes”; donde cada estudio de homogeneidad entre/dentro para pH y densimetría tendrá el nombre respectivo en el documento.

Determinación de la homogeneidad entre de botellas del CMR – contenido alcohólico mediante densimetría.

Las unidades muestreadas para realizar este estudio, se describen en el Cuadro A 36 (anexos).

Según el planteamiento experimental descrito en la metodología, se analizaron los resultados preliminarmente por orden de preparación y por orden de medición. Estos gráficos se detallan en la Figura A 3 y Figura A 4 de la sección de anexos. Se concluye, a través una prueba *t* de significancia de las pendientes obtenidas (β_n), que se retiene la hipótesis nula H_0 en ambos casos. Es decir, no hay ninguna tendencia que afecte los procesos de medición ni preparación. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado “Homogeneidad EtOH entrebotellas” en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección.

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. En ambos casos se retiene (H_0) por lo que se puede proceder con el ANOVA. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado “Homogeneidad EtOH entrebotellas” en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección.

Basándose en el modelo de distribución normal y la homocedasticidad comprobados, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

H_0 : No hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas.

H_1 : Hay diferencias estadísticamente significativas en al menos un media de las unidades ensayadas.

Los resultados del ANOVA descrito se observan en Cuadro XXVII adjunto.

Cuadro XXVII: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor, para el estudio de homogeneidad entre unidades por densimetría.

Entrada	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p-valor
Unidad	10	5.51	0.55	1.98	0.13
Residual	12	3.34	0.28		

Con la evidencia mostrada, se retiene H_0 : no puede comprobarse que hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas (p -valor = 0.13). Es decir, el material indica ser homogéneo entre unidades.

Finalmente, para concluir el estudio de homogeneidad entre botellas para el CMR en su determinación de concentración de etanol por densimetría, se calcula la incertidumbre asociada partir de la Ecuación 21.

$$\begin{aligned} \text{Si } s_s > s_w; \mu_{hom} &= s_s \\ \text{Si } s_s < s_w; \mu_{hom} &= \sqrt{\frac{s_w^2}{m} \cdot 4 \sqrt{\frac{2}{v_w}}} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 21}$$

Con s_s siendo la desviación estándar entre botellas, s_w la desviación estándar dentro de botellas, m los grados de libertad y v_w las unidades ensayadas. Los resultados, en el Cuadro XXVIII, indican que como $s_s < s_w$, por lo tanto, la incertidumbre por homogeneidad entre botellas μ_{hom} corresponde a $\sqrt{\frac{s_w^2}{m} \cdot 4 \sqrt{\frac{2}{v_w}}}$, es decir, 0.24.

Cuadro XXVIII: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad entre botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR, por densimetría.

s_s	s_w	v_w	m	$\mu_{hom \text{ entre}}$
0.36947	0.52735	12	2	0.24

Determinación de la homogeneidad dentro de botellas del CMR – contenido alcohólico mediante densimetría.

Las unidades muestreadas para realizar este estudio, se describen en el Cuadro XXIX a continuación.

Cuadro XXIX: Unidades muestreadas del CMR de alcohol en gel para el estudio de homogeneidad dentro botellas mediante densimetría.

Botella	Código Asignado (réplica 1)	Código Asignado (réplica 2)	Código Asignado (réplica 3)
3	G1.1	G1.2	G1.3
69	G2.1	G2.2	G2.3
4	G3.1	G3.2	G3.3
13	G4.1	G4.2	G4.3

Según el planteamiento experimental descrito en la metodología, se analizaron los resultados preliminarmente por orden de preparación y por orden de medición. Estos gráficos se detallan en la Figura A 5 y Figura A 6 de la sección de anexos. Se concluye, a través una prueba t de significancia de las pendientes obtenidas (β_n), que se retiene la hipótesis nula H_0 en ambos casos. Es decir, no hay ninguna tendencia que afecte los procesos de medición ni preparación. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Homogeneidad EtOH dentro botellas" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección.

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. En ambos casos se retiene (H_0) por lo que se puede proceder con el ANOVA. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar

el informe titulado "Homogeneidad EtOH dentrobotellas" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección. Basándose en el modelo de distribución normal y la homocedasticidad comprobados, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

H_0 : No hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas.

H_1 : Hay diferencias estadísticamente significativas en al menos un media de las unidades ensayadas.

Los resultados del ANOVA descrito se observan en Cuadro XXX adjunto.

Cuadro XXX: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor, para el estudio de homogeneidad dentro de unidades por densimetría.

Entrada	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p-valor
Unidad	3	3.79	1.26	1.18	0.38
Residual	8	8.58	1.07		

Con la evidencia mostrada, se retiene H_0 : no puede comprobarse que hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas (p -valor = 0.38). Es decir, el material indica ser homogéneo dentro de unidades.

Finalmente, para concluir el estudio de homogeneidad dentro de botellas para el CMR en su determinación de concentración de etanol por densimetría, se calcula la incertidumbre asociada partir de la Ecuación 21. Los resultados se detallan en el Cuadro XXXI.

Cuadro XXXI: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad dentro de botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR, por densimetría.

S_s	S_w	ν_w	m	$\mu_{hom dentro}$
0.25166	1.0355	8	3	1.04

Determinación de la homogeneidad entre de botellas del CMR – pH.

Las unidades muestreadas para realizar este estudio, se describen en el Cuadro A 36 (anexos).

Según el planteamiento experimental descrito en la metodología, se analizaron los resultados preliminarmente por orden de preparación y por orden de medición. Estos gráficos se detallan en la Figura A 7 y Figura A 8 de la sección de anexos. Se concluye, a través una prueba t de significancia de las pendientes obtenidas (β_n), que se retiene la hipótesis nula H_0 en ambos casos. Es decir, no hay ninguna tendencia que afecte los procesos de medición ni preparación. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Homogeneidad pH entrebotellas" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección.

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se

planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. En el caso de Shapiro-Wilk, se rechaza (H_0) por lo que se puede proceder con un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para el caso de la Prueba de Cochran, se retiene H_0 . En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Homogeneidad pH entrebotellas" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección. Basándose en el modelo de distribución no normal y la homocedasticidad comprobada, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

H_0 : No hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas.

H_1 : Hay diferencias estadísticamente significativas en al menos un media de las unidades ensayadas.

Los resultados del ANOVA descrito se observan en el Cuadro XXXII adjunto.

Cuadro XXXII : Resultados del ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) para el análisis de homogeneidad entre unidades de pH.

Estadístico K	Grados de libertad	p-valor
19.76	11	0.049

Con la evidencia mostrada, se rechaza H_0 : al menos una unidad presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a las demás (p-valor = 0.049). Es decir, el material indica no ser homogéneo entre unidades. Este dato indica que la incertidumbre asociada a la falta de homogeneidad observada, será mayor para cubrir el riesgo inherente que esto representa.

Finalmente, para concluir el estudio de homogeneidad entre botellas para el CMR en su determinación de pH, se calcula la incertidumbre asociada partir de la Ecuación 21. Los resultados se detallan en el Cuadro XXXIII.

Cuadro XXXIII: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad de pH entre botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR.

s_s	s_w	v_w	m	$\mu_{hom entre}$
0.0687	0.02372	12	2	0.069

Determinación de la homogeneidad dentro de botellas del CMR – pH.

Las unidades muestreadas para realizar este estudio, se describen en el Cuadro XXIX. Según el planteamiento experimental descrito en la metodología, se analizaron los resultados preliminarmente por orden de preparación y por orden de medición. Estos gráficos se detallan en la Figura A 9 y Figura A 10 de la sección de anexos. Se concluye, a través una prueba t de significancia de las pendientes obtenidas (β_n), que se retiene la hipótesis nula H_0 en ambos casos. Es decir, no hay ninguna tendencia que afecte los procesos de medición ni preparación. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Homogeneidad pH dentrobotellas" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección.

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las

varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. En ambos casos se retiene (H_0) por lo que se puede proceder con el ANOVA. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Homogeneidad pH dentro botellas" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección. Basándose en el modelo de distribución normal y la homocedasticidad comprobados, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

H_0 : No hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas.

H_1 : Hay diferencias estadísticamente significativas en al menos un media de las unidades ensayadas.

Los resultados del ANOVA descrito se observan en el Cuadro XXXIV adjunto.

Cuadro XXXIV: Resultados del ANOVA para el análisis de homogeneidad dentro de unidades de pH.

Entrada	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p-valor
Unidad	3	0.02	0.006	3.02	0.12
Residual	6	0.01	0.002		

Con la evidencia mostrada, se retiene H_0 : no puede comprobarse que hay diferencias estadísticamente significativas de las medias de las unidades ensayadas (p -valor = 0.12). Es decir, el material indica ser homogéneo dentro de unidades.

Finalmente, para concluir el estudio de homogeneidad dentro de botellas para el CMR en su determinación de pH, se calcula la incertidumbre asociada partir de la Ecuación 21. Los resultados se detallan en el Cuadro XXXV.

Cuadro XXXV: Resultados de las desviaciones estándar de los datos de homogeneidad dentro de botellas, para el cálculo de la incertidumbre de homogeneidad del CMR, por densimetría.

S_S	S_w	ν_w	m	$\mu_{hom\ dentro}$
0.03894	0.04469	6	3	0.04469

4.5. Evaluación de la Estabilidad del CMR.

Al certificar una característica específica de un material de referencia, se debe determinar la estabilidad de este en el tiempo y en condiciones específicas para estandarizar y definir temperaturas de almacenamiento en los estantes del fabricante y también temperaturas de transporte hacia un usuario, de manera que movilizarlo no represente una afectación significativa en el material. Monitorear constantemente las propiedades certificadas del material también permite establecer fechas de caducidad donde ya la certificación empieza a presentar variaciones relevantes. Por esta razón, hay dos estudios de estabilidad: a largo plazo (el más utilizado, duración de 24-36 meses), relacionado con el almacenaje por lo que se utiliza una temperatura de referencia constante; y a corto plazo (duración de 1 a 2 meses) relacionado más con el transporte y condiciones particulares, por lo que utiliza dos o más temperaturas. Para efectos de este trabajo, se realiza un estudio a corto plazo (1 mes, estudio isócrono a 37 °C y 20 °C); no obstante, el estudio a largo plazo se realiza en las instalaciones del LCM por un periodo de 36 siguientes a la fabricación.

Para todo estudio de estabilidad, se debe realizar una regresión lineal según se describe en la Ecuación 22. La premisa detrás de esto consiste en que, si la pendiente no es igual a cero tras el periodo total del estudio, hay una tendencia a la baja (o a la alta) del valor certificado efecto directo de las condiciones a las que se sometió el material. Por otro lado, si es estadísticamente igual a cero, no hay un efecto de la temperatura en los valores certificados y por lo tanto se considera estable.

$$y = \beta_0 + \beta_1 t \quad \text{Ecuación 22}$$

Siendo y el resultado obtenido, β_0 el intercepto, β_1 la pendiente y t es el tiempo del análisis.

Para el uso del ANOVA para determinar si la pendiente del modelo es estadísticamente igual a cero, se requieren comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, por lo que se realiza de previo las pruebas de Shapiro-Wilk para normalidad y una prueba de Cochran para determinar varianzas iguales en el ámbito.

Los resultados finales reportados utilizados para estos estudios, se detallan en el Google Drive: <https://drive.google.com/drive/folders/1leg3KVeTmoUHC6ArH6zPs-la2YW69f7z>, dentro de la subcarpeta "Excel con datos procesados finales" llamados: Estabilidad_densimetria_EtOH, Estabilidad_FID_EtOH y Estabilidad_pH.

Los informes asociados emitidos por el LCM con los resultados aquí presentes, los estudios y las conclusiones finales para cada etapa descrita en las secciones siguientes, se encuentran en el Google Drive: <https://drive.google.com/drive/folders/1leg3KVeTmoUHC6ArH6zPs-la2YW69f7z>, dentro de la subcarpeta "Informes"; donde cada estudio de estabilidad para pH, GC-FID y densimetria tendrá el nombre respectivo en el documento.

Determinación de la estabilidad del CMR – GC-FID.

Las ocho unidades utilizadas en el estudio de estabilidad corresponden a las mostradas en el Cuadro XXXVI. Los valores obtenidos para esta determinación de las mediciones, las destilaciones y las diluciones se observan en el Cuadro A 38, Cuadro A 39 y Cuadro A 40 de la sección de Anexos.

Cuadro XXXVI: Unidades muestreadas del CMR de alcohol en gel para el estudio de estabilidad en el valor de concentración con cromatografía de gases.

Botella	Código Asignado (réplica 1)	Código Asignado (réplica 2)
42	E1.1	E1.2
50	E2.1	E2.2
25	E3.1	E3.2
24	E4.1	E4.2
43	E5.1	E5.2
18	E6.1	E6.2
8	E7.1	E7.2
70	E8.1	E8.2

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. En ambos casos se retiene (H_0) por lo que se puede proceder con el ANOVA. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Estabilidad MR FID CP" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección. Basándose en el modelo de distribución normal y la homocedasticidad comprobados, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 0$$

Se obtiene la regresión lineal mostrada en la Figura 37.

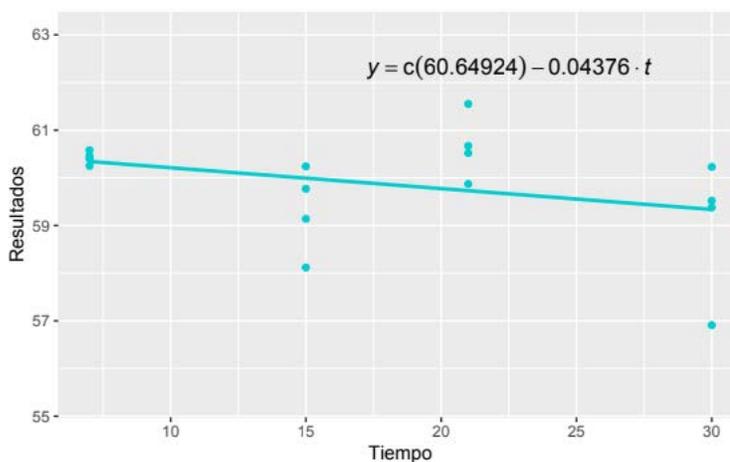


Figura 37: Regresión lineal esbozada a partir de los datos obtenidos de concentración de etanol en función del tiempo, con su ecuación asociada, estudio de estabilidad con cromatografía de gases. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos del ANOVA de un factor se obtienen en el Cuadro XXXVII adjunto.

Cuadro XXXVII: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor para la determinación de la igualdad a cero de la pendiente de la regresión en la determinación de estabilidad con cromatografía de gases.

Datos	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p-valor
Pendiente	1	2.17	2.17	1.90	0.19
Residuales	14	15.99	1.14		

Con la evidencia mostrada, se retiene H_0 : no puede comprobarse que la pendiente obtenida es estadísticamente diferente de cero (p -valor = 0.19). Es decir, el material indica ser estable a corto plazo bajo las condiciones a las que se sometió.

Finalmente, para concluir el estudio de estabilidad a corto plazo por *GC-FID*, se calcula la incertidumbre asociada utilizando la Ecuación 23: la desviación de la pendiente (s_{β_1}) para un tiempo total

(t) de 30 días y un tiempo inicial de cero días (t_0). Esto a partir de lineamientos de la ISO Guide 35¹⁰. Los resultados de esta estimación se detallan en el Cuadro XXXVIII.

$$\mu_{estab} = s_{\beta_1}(t + t_0) \quad \text{Ecuación 23}$$

Cuadro XXXVIII: Resultados obtenidos para la incertidumbre de estabilidad del valor de concentración de etanol en el CMR, con cromatografía de gases.

Desviación de la pendiente (s_{β_1})	Tiempo total (t, días)	μ_{estab}
0.032	30	0.95

Determinación de la estabilidad del CMR – Densimetría.

Las ocho unidades utilizadas en el estudio de estabilidad corresponden a las mostradas en el Cuadro XXXVI. Los valores obtenidos para esta determinación de las mediciones y las destilaciones se observan en el Cuadro A 38 y Cuadro A 40 de la sección de Anexos. En otras palabras, a las destilaciones de la sección anterior, se le tomó una porción sin diluir para medir en el densímetro y otra porción para diluir y medir en el cromatógrafo de gases.

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. En ambos casos se retiene (H_0) por lo que se puede proceder con el ANOVA. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Estabilidad MR Dens CP" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección. Basándose en el modelo de distribución normal y la homocedasticidad comprobados, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 0$$

Se obtiene la regresión lineal mostrada en la Figura 38.

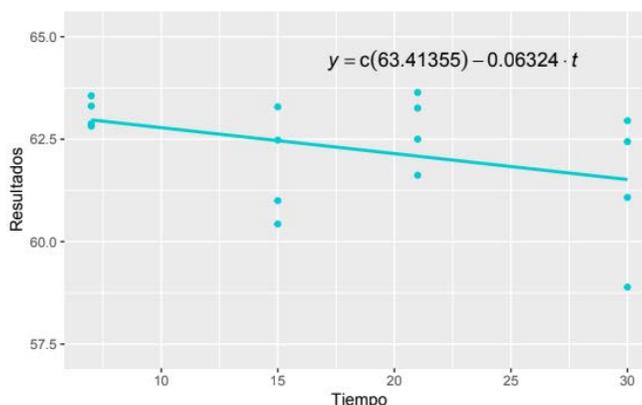


Figura 38: Regresión lineal esbozada a partir de los datos obtenidos de concentración de etanol en función del tiempo, con su ecuación asociada, para estudio de estabilidad con densimetría. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos del ANOVA de un factor se obtienen en el Cuadro XXXIX adjunto.

Cuadro XXXIX: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor para la determinación de la igualdad a cero de la pendiente de la regresión en la determinación de estabilidad con densimetría.

Datos	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p-valor
Pendiente	1	4.52	4.52	2.93	0.11
Residuales	14	21.64	1.54		

Con la evidencia mostrada, se retiene H_0 : no puede comprobarse que la pendiente obtenida es estadísticamente diferente de cero (p-valor = 0.11). Es decir, el material indica ser estable a corto plazo bajo las condiciones a las que se sometió.

Finalmente, para concluir el estudio de estabilidad a corto plazo por densimetría, se calcula la incertidumbre asociada utilizando la Ecuación 23, la desviación de la pendiente (s_{β_1}) para un tiempo total (t) de 30 días y un tiempo inicial de cero días (t_0). Esto a partir de lineamientos de la ISO Guide 35¹⁰. Los resultados de esta estimación se detallan en el Cuadro XL.

Cuadro XL: Resultados obtenidos para la incertidumbre de estabilidad del valor de concentración de etanol en el CMR, con densimetría.

Desviación de la pendiente (s_{β_1})	Tiempo total (t, días)	μ_{estab}
0.03697	30	1.10911

Determinación de la estabilidad del CMR – pH.

Las ocho unidades utilizadas en el estudio de estabilidad corresponden a las mostradas en el Cuadro XXXVI. Estas fueron atemperadas a 20 °C, agitadas de previo a abrirlas y medidas en un orden de réplica 1 de 1-8 en orden numérico creciente y en la réplica 2 de la 5-8 y luego de la 1-4. Los valores obtenidos para esta determinación se observan en el Cuadro A 41 de la sección de Anexos.

Para proceder con el ANOVA de un factor, se requiere hacer una comprobación de los supuestos del ANOVA, los cuales corresponden a que los resultados cumplan con una distribución normal y que las varianzas sean estadísticamente equivalentes. Para esto, por recomendación de expertos del LCM, se planean una prueba Shapiro-Wilk y una Prueba de Cochran. Se comprueba la distribución normal reteniendo H_0 , no obstante, en el caso de la prueba de Cochran, el resultado fue rechazar H_0 , en este caso se observan resultados adversos en la homoscedasticidad en el último punto de la tendencia. Se procede con el ANOVA convencional, mas se debe tomar los resultados con cautela. En caso de revisar planteamiento y resultados de estas pruebas, consultar el informe titulado "Estabilidad MR pH CP" en el link de Google Drive mostrado al inicio de esta sección. Basándose en el modelo de distribución normal comprobado, se realiza un ANOVA de un factor, cuyo planteamiento de hipótesis se describe a continuación:

$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 0$$

Se obtiene la regresión lineal mostrada en la Figura 39.

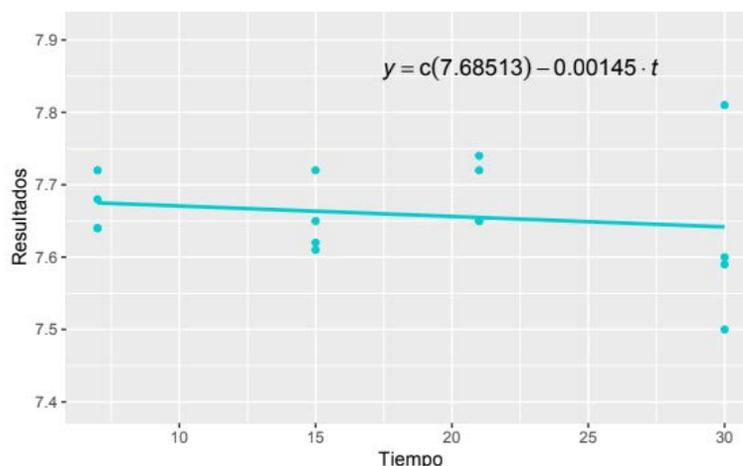


Figura 39: Regresión lineal esbozada a partir de los datos obtenidos de pH en función del tiempo, con su ecuación asociada. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos del ANOVA de un factor se obtienen en el Cuadro XLI adjunto.

Cuadro XLI: Resultados obtenidos del ANOVA de un factor para la determinación de la igualdad a cero de la pendiente de la regresión en la determinación de estabilidad para pH.

Datos	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p-valor
Pendiente	1	0.002	0.002	0.430	0.523
Residuales	14	0.077	0.005		

Con la evidencia mostrada, se retiene H_0 : no puede comprobarse que la pendiente obtenida es estadísticamente diferente de cero (p -valor = 0.523). Es decir, el material indica ser estable a corto plazo bajo las condiciones a las que se sometió.

Finalmente, para concluir el estudio de estabilidad a corto plazo del pH, se calcula la incertidumbre asociada utilizando la Ecuación 23, la desviación de la pendiente ($s_{\beta 1}$) para un tiempo total (t) de 30 días y un tiempo inicial de cero días (t_0). Esto a partir de lineamientos de la ISO Guide 35¹⁰. Los resultados de esta estimación se detallan en el Cuadro XLII.

Cuadro XLII: Resultados obtenidos para la incertidumbre de estabilidad del valor de pH en el CMR.

Desviación de la pendiente ($s_{\beta 1}$)	Tiempo total (t, días)	μ_{estab}
0.002205	30	0.06616

4.6. Valor de concentración, pH e incertidumbre finales para el CMR.

Una vez obtenidos los resultados de caracterización para los valores de concentración del etanol en el CMR y el valor de pH, con sus incertidumbres de caracterización, homogeneidad (dentro y entre unidades) y estabilidad para el transporte (corto plazo); ya se puede reportar los valores finales del CMR según establece la guía ISO 35¹⁰. A continuación, se detalla para cada parámetro el valor certificado con su incertidumbre asociada.

Valor reportado de concentración de etanol (como fracción en masa expresado como porcentaje).

El valor de caracterización para el contenido de etanol en fracción en masa expresada como porcentaje toma en cuenta el valor obtenido por cromatografía de gases (*GC-FID*) y densimetría. Los valores obtenidos de caracterización se combinan, tanto en su concentración como sus incertidumbres, con el método de Der Simonian-Laird utilizando el *NIST consensus builder*. Este método considera el dato de incertidumbre oscura a la incertidumbre total de caracterización, dato mayor a la obtenida por el método de promedios ponderados y será elegida para reportar la $\mu_{\text{caracterización}}$ final. Los datos obtenidos del software mencionado se detallan en la Figura A 2 de la sección de anexos. Los resultados utilizados para cada método y sus incertidumbres, se detallan en el Cuadro *XLIII* adjunto. Los valores de incertidumbre de homogeneidad (entre y dentro de unidades) y estabilidad reportan un solo resultado ya que se elige el de mayor aporte. Las incertidumbres estándar se combinan según la Ecuación 4.

Cuadro *XLIII*: Valores obtenidos de concentración de etanol (%) por método de análisis y sus incertidumbres asociadas.

Método	Valor obtenido (%)	$\mu_{\text{caracterización}}$	$\mu_{\text{hom.entre}}$	$\mu_{\text{hom.dentro}}$	μ_{estab}	μ_{CMR}
GC-FID	61.50	0.70	0.24	1.04	1.11	1.63
Densimetría	62.49	0.65				
Combinación (Der Simonian-Laird)	62.03	0.54				

A partir de estos datos, el valor reportado de caracterización del CMR para su concentración en fracción en masa expresada como porcentaje sería $(62.0 \pm 3.3) \%$, con la incertidumbre expandida ($\pm U$, %) con un factor de cobertura k igual a 2, para un 95 % de confianza aproximado, asumiendo distribución normal.

Valor reportado pH.

El valor obtenido de pH con sus aportes de incertidumbre se detalla en el Cuadro *XLIV* a continuación, en función de los valores obtenidos de los estudios de las secciones anteriores. Las incertidumbres estándar se combinan según la Ecuación 4.

Cuadro *XLIV*: Valor obtenido de pH para el CMR y sus incertidumbres asociadas.

Método	Valor obtenido	μ_{char}	$\mu_{\text{homog.entre}}$	$\mu_{\text{homog.dentro}}$	μ_{estab}	μ_{CMR}
pH	7.669	0.0125	0.0687	0.0447	0.06616	0.106

A partir de estos datos, el valor reportado de caracterización del CMR para pH sería (7.7 ± 0.2) , con un factor de cobertura k igual a 2, para un 95 % de confianza aproximado, asumiendo distribución normal.

Una vez certificado el material en concentración y pH, realiza una transición de Candidato a Material de Referencia a Material de Referencia (MR). No obstante, su condición de Material de Referencia Certificado (MRC) dependerá del resultado obtenido del estudio de estabilidad a largo plazo, de esta manera

cumplir con todos los requisitos establecidos para ser un MRC. Por lo tanto, la transición a MRC se dará una vez concluido ese estudio, el cual está fuera del alcance de este proyecto y dependerá de futuros proyectos del LCM.

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

El candidato a material de referencia (CMR) se produjo en Sur Química S.A. con todos los parámetros de control de calidad asociados dentro de los ámbitos aceptados. En esta etapa, se recomienda aumentar el tiempo de agitación a más de dos horas posterior a la integración de todos los componentes de la fórmula, ya que al ser un material complejo aumentar el tiempo podría disminuir el riesgo de heterogeneidad en el lote, situación observada solamente en la determinación de homogeneidad entre botellas de pH. Se recomienda sellar las tapas con *liner* adhesivo por inducción y no manipular la tapa por al menos 5 minutos, ya que si se manipula inmediatamente puede mover el *liner* ya que el adhesivo pudo no haberse secado aún. El total de muestras del MR, quitando las utilizadas para certificar sus valores de concentración y pH, corresponden a 498.

Con respecto a la Alianza Público Privada, este proyecto deja un precedente que, si son planeados con equidad en beneficios y deberes, pueden ser una excelente forma de convenio para beneficio de ambas partes en intercambios de trabajos estratégicos. Se concluye en esta sección que los deberes de cada institución en la APP fueron cubiertos en su totalidad y mediante esta alianza se generó y caracterizó el MR de alcohol en gel.

En la validación de metodologías, se determinó que el método por cromatografía de gases con detector por ionización de llama es adecuado para su uso previsto en la cuantificación de etanol. El método, con esos parámetros de equipo y la fase estacionaria elegida, es específico para etanol ya que formulaciones con mezclas de etanol-IPA no generan picos separados y bien resueltos. Se recomienda optar por una columna polar que pueda separar estos dos analitos de una mejor manera y así aprovechar las cuantificaciones conjuntas. El método por densimetría se encuentra validado a nivel interno del LCM y la verificación con un MRC de etanol evidencia que el equipo se mantiene midiendo apropiadamente, dentro de tolerancias. Esto significa que es adecuado para el uso previsto.

El método de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier no es adecuado para el uso previsto ya que no logra aprobar los parámetros de validación y sus tolerancias. Para este caso particular, una alternativa sería subir el ámbito de la curva por bracketing o bien generar más patrones en la curva de calibración para determinar si a mayor concentración hay mejor desempeño en la validación. Otra alternativa para mejorar los resultados, sería la integración manual de los picos de absorbancia ya que el utilizado (integración automática del software) puede no estar tomando los datos desde una línea base totalmente horizontal en cero. Se recomienda considerarlo para el procesamiento de datos. Optimizar el método sería beneficioso porque el equipo y el método como tal poseen ciertas ventajas, entre ellas: rapidez de medición, menor costo de insumos para operarlo y software más amigable y rápido para la obtención de resultados.

Con respecto al material producido se concluye que el valor reportado final de concentración de etanol corresponde a $(62.0 \pm 3.3) \%$, con un factor de cobertura k igual a 2, para un 95 % de confianza aproximadamente, asumiendo distribución normal. Se concluye que es un material homogéneo y estable (a corto plazo, bajo condiciones específicas del alcance de este estudio). Con respecto al pH, el valor final reportado corresponde a (7.7 ± 0.2) , con un factor de cobertura k igual a 2, para un 95 % de confianza aproximadamente, asumiendo distribución normal. Se concluye que el material es homogéneo, pero presenta cierto problema de estabilidad a corto plazo, a 37 °C, cuando permanece en periodos mayores de

21 días. Se concluye que esto no es un problema significativo ya que son condiciones de transporte que no se cumplirán, es decir, no estará en transporte un periodo tan largo de días. Al estar caracterizado en estos valores según requisitos de la Guía ISO 35, se habrá generado un Material de Referencia capaz de establecer la veracidad de las mediciones realizadas a este tipo de productos en el mercado nacional. También será capaz de asegurar su incertidumbre y por consiguiente se podrá garantizar la confianza de las propiedades químicas de interés a los usuarios y así ser comercializados de forma justa.

Referencias

- (1) Torrance, G. W. Utility Approach to Measuring Health-Related Quality of Life. *J. Chronic Dis.* 1987, 40 (6), 593–600. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90019-1).
- (2) Hao, Y. J.; Wang, Y. L.; Wang, M. Y.; Zhou, L.; Shi, J. Y.; Cao, J. M.; Wang, D. P. The Origins of COVID-19 Pandemic: A Brief Overview. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022, 69 (6), 3181–3197. <https://doi.org/10.1111/tbed.14732>.
- (3) Bixby, L. R. Método Para La Estimación de La Tasa R de Covid-19 (Documento En Revisión). 2021, 19, 1–3.
- (4) United Nations. Covid-19 and the Need for Action on Mental Health. *United Nations Policy Br.* 2020, 1–17.
- (5) Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* 2020, 87 (4), 281–286. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6>.
- (6) Hillier, M. D. Using Effective Hand Hygiene Practice to Prevent and Control Infection. *Nurs. Stand.* 2020, 35 (5), 45–50. <https://doi.org/10.7748/ns.2020.e11552>.
- (7) Gobierno de Costa Rica. Reglamento Técnico RTCR 501:2020 Productos Cosméticos, Alcohol En Gel Para Manos. Especificaciones y Requisitos Para El Registro Sanitario. Sistema Costarricense de Información Jurídica: Costa Rica 2020.
- (8) Inteco. Inte Q185:2020 - Determinación Del PH En Alcohol En Gel. Método de Ensayo. 2020, No. 506.
- (9) Inteco. Inte Q184:2020 - Determinación Del Grado Alcohólico En Alcohol En Gel. Método de Ensayo. 2020, No. 506.
- (10) ISO. ISO Guide 35:2017. 2017, 2017.
- (11) Zhou, P.; Yang, X. Lou; Wang, X. G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H. R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C. L.; Chen, H. D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R. Di; Liu, M. Q.; Chen, Y.; Shen, X. R.; Wang, X.; Zheng, X. S.; Zhao, K.; Chen, Q. J.; Deng, F.; Liu, L. L.; Yan, B.; Zhan, F. X.; Wang, Y. Y.; Xiao, G. F.; Shi, Z. L. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* 2020, 579 (7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- (12) World Health Organization (WHO). WHO statement on novel coronavirus in Thailand.
- (13) World Health Organization (WHO). Timeline: WHO’s COVID-19 response.
- (14) Mendez, A. El Desempleo Preocupa a La Ciudadanía Más Que El COVID-19. 2020, p 4.
- (15) Ferretti, L.; Wymant, C.; Kendall, M.; Zhao, L.; Nurtay, A.; Abeler-Dörner, L.; Parker, M.; Bonsall, D.; Fraser, C. Quantifying SARS-CoV-2 Transmission Suggests Epidemic Control with Digital Contact Tracing. *Science (80-.)*. 2020, 368 (6491), 1–13. <https://doi.org/10.1126/science.abb6936>.
- (16) Kratzel, A.; Kratzel, A.; Todt, D.; V’kovski, P.; V’kovski, P.; Steiner, S.; Steiner, S.; Gultom, M.; Gultom, M.; Thao, T. T. N.; Thao, T. T. N.; Ebert, N.; Ebert, N.; Holwerda, M.; Holwerda, M.; Steinmann, J.; Steinmann, J.; Niemeyer, D.; Dijkman, R.; Dijkman, R.; Kampf, G.; Drosten, C.; Steinmann, E.; Thiel, V.; Thiel, V.; Pfaender, S. Inactivation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 by WHO-Recommended Hand Rub Formulations and Alcohols. *Emerg. Infect. Dis.* 2020, 26 (7), 1592–1595. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200915>.
- (17) Neeltje van Doremalen, P.; Infectious, (National Institute of Allergy and; Diseases); Trenton Bushmaker, B. S. N. I. of A. and; Diseases); Dylan H. Morris, M. P. (Princeton U. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 2020, 0–2.
- (18) Berardi, A.; Perinelli, D. R.; Merchant, H. A.; Bisharat, L.; Basheti, I. A.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G. F. Hand Sanitisers amid CoViD-19: A Critical Review of Alcohol-Based Products on the Market and Formulation Approaches to Respond to Increasing Demand. *Int. J. Pharm.* 2020, 584 (April), 119431. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119431>.
- (19) World Health Organization (WHO). Guide to Local Production: WHO-Recommended Handrub Formulations Introduction: 2020, No. April, 9.
- (20) Dear, K.; Grayson, L.; Nixon, R. Potential Methanol Toxicity and the Importance of Using a Standardised Alcohol-Based Hand Rub Formulation in the Era of COVID-19. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2020, 9 (1), 10–12. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00788-5>.
- (21) Nexstar Media Wire. More Products Added to FDA Hand Sanitizer Recall List. *Fox News.* 2020, p 2.

- (22) La Gaceta. Reglamento Del Órgano de Reglamentación Técnica N°32068. 2002.
- (23) INTECO. INTE/ISO Guía 33:2017. 2017, No. 506.
- (24) Zúñiga, S. M. R.; Solano, J. C. *Certificación de Un Material de Referencia de Dicromato de Potasio Para La Calibración de Espectrofotómetros Ultravioleta Visible*; 2002.
- (25) Calderón, B.; Molina, G.; Lois, M.; Vargas, A.; Soto, J. *Material de Referencia de Leche En Polvo y Su Empleo En Rondas Interlaboratoriales Para Alimentos: Homogeneidad e Incertidumbre.*; 2014.
- (26) Molina, G. Implementación de Una Metodología Para El Estudio de La Homogeneidad y La Estabilidad En El Desarrollo de Un Material de Referencia de Cadmio, Plomo y Cromo En Disolución Acuosa Para Un Ensayo de Aptitud. 2013.
- (27) Jiménez, L. Sistemas de Medición y Aseguramiento Metrológico. Normalización y Metrología. 2007, 80.
- (28) Marcos Casquero, M. del C. Acercamiento a La Metrología. *Aldaba* 1984, No. 2, 123–131. <https://doi.org/10.5944/aldaba.2.1984.19515>.
- (29) Robert, A.; Rasch, F. Conceptos Básicos de Metrología Industrial. 1–7.
- (30) Vicente, P.; Ginés, S. Integración de Máquinas Medidoras Por Coordenadas En Entornos CAD/CAM. *Univ. Politécnica Cart.* 2005, 1–7.
- (31) Marbán, R.; Pellecer, J. *Metrología Para No-Metrólogos*; 2002.
- (32) Metrology, T. De; Redgrave, F. Metrología Abreviada. 2008, 85.
- (33) JCGM. Vocabulario Internacional de Metrología: Conceptos Fundamentales, Generales y Términos Asociados. *Cent. Español Metrol.* 2012, 3 (2), 88. <https://doi.org/10.1021/ja01341a021>.
- (34) Esquivel, A. E. *Metrología y Sus Aplicaciones*, Primera Ed.; México, 2014.
- (35) Escamilla Esquivel, A. *Metrología y Sus Aplicaciones.*; 2000.
- (36) Caixeiro, J. M. R.; Souza, V. De; Silva, R. A. L.; Bandeira, R. D. C. C.; Valente, L. A. N. Material De Referencia Certificado – Etanol En Agua Certified Reference Materials - Ethanol in Water. 1–10.
- (37) INTECO. INTE/ISO Guía 30:2017. 2017, 1–40.
- (38) Schmid, W. A.; Lazos Martínez, R. J. Guide to Estimate the Measurement Uncertainty. *Natl. Cent. Metrol. Mex.* 2000, 27.
- (39) 2008, J. 100: Guía Para La Expresión de La Incertidumbre de Medida. *La, B., Iso, N. (n.d.). Doc. los procedimientos técnicos y Organ. un Lab. Metrol. presión bajo la norma iso/iec 17025 1. Técnica, N. (2008). Iso-9001-2008-Icontec. (571). Prim. (2008). JCGM 1012008 Evaluación 2014, 79 (1), 20–50.*
- (40) Pérez, M. del M. Estimación de Incertidumbres. Guía GUM. *Rev. Española Metrol.* 2012, 114,130.
- (41) Pauwels, J.; Lamberty, A.; Schimmel, H. Homogeneity Testing of Reference Materials. *Accredit. Qual. Assur.* 1998, 3 (2), 51–55. <https://doi.org/10.1007/s007690050186>.
- (42) Linsinger, T. P. J.; Pauwels, J.; Van Der Veen, A. M. H.; Schimmel, H.; Lamberty, A. Homogeneity and Stability of Reference Materials. *Accredit. Qual. Assur.* 2001, 6 (1), 20–25. <https://doi.org/10.1007/s007690000261>.
- (43) Arvizu Torres, M. del R.; Valle Moya, E.; Reyes del Valle, A. Estudios de Estabilidad En Materiales de Referencia Certificados En Matriz Acuosa Empleando El Método de Pérdidas de Transpiración. *Simp. Metrol.* 2010, 1–9.
- (44) Pauwels, A. L. H. S. J. The Study Of The Stability Of Reference Materials. 1998, 359–361.
- (45) Eurachem. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*; 1998.
- (46) Klinkenberg, A.; Zuiderweg, F. J. Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography. *Chem. Eng. Sci.* 1956, 5 (6), 271–289. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(56\)80003-1](https://doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1).
- (47) Guiochon, G. A. Chromatography, Today and Tomorrow. *Anal. Chim. Acta* 1993, 283 (1), 309–319. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85237-E](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)85237-E).
- (48) Rahman, M. M.; Abd El-Aty, A. M.; Choi, J.-H.; Shin, H.-C.; Shin, S. C.; Shim, J.-H. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Anal. Sep. Sci.* 2015, 823–834. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep024>.
- (49) Holler, J.; Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 2015; Vol. 5.
- (50) Yagües, G. V. Cromatografía de Gases. *Cromatografía* 2008, 1–19.
- (51) Hage, D. S. *Chromatography*, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>.

- (52) Middlehurst, J.; Kennett, B. Flame Ionization Detectors. *J. Chromatogr. A* 1963, 10 (C), 294–302. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)92312-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)92312-x).
- (53) Tobergte, D. R.; Curtis, S. Estudio Comparativo Del Proceso de Corrosión En Recubrimientos Cerámicos. Metálicos y Orgánicos Mediante Técnicas Electroquímicas. *J. Chem. Inf. Model.* 2013, 53 (9), 1689–1699.
- (54) AOAC. Percentages by Volume at 60F of Ethyl Alcohol Corresponding to Apparent Specific Gravity. 2005, 16–34.
- (55) Webb, P. a. Volume and Density Determinations for Particle Technologists. *Society* 2001, No. February, 1–16.
- (56) Medina, V. A. S. Estudio de La Temperatura, Humedad Relativa, Presión y Densidad Como Variables de Influencia Para La Medición de Tensión Superficial de Líquidos. 2013, 1–21.
- (57) ISO. ISO 15212-1: Oscillation-Type Density Meters - Part 1: Laboratory Instruments. 1998, No. 1, 11.
- (58) Paar, A. Instruction Manual DMA 4100 M DMA 4500 M DMA 5000 M. 2012, 152.
- (59) Mettler Toledo. De Picnómetros e Hidrómetros a Densímetros Digitales.
- (60) Daomin Zhou, D. *Microelectrodes for In-Vivo Determination of PH*; Elsevier Inc., 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50012-X>.
- (61) Makarychev-mikhailov, S.; Shvarev, A.; Bakker, E. *New Trends in Ion-Selective Electrodes*; Elsevier Inc., 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373738-0.50006-4>.
- (62) Cleal, M.; Gibbon, A.; Fontana, B. D.; Parker, M. O. The Importance of PH: How Aquarium Water Is Affecting Behavioural Responses to Drug Exposure in Larval Zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2020, 199 (July), 173066. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173066>.
- (63) Aodah, A. H.; Bakr, A. A.; Booq, R. Y.; Rahman, M. J.; Alzahrani, D. A.; Alsulami, K. A.; Alshaya, H. A.; Alsuabeyl, M. S.; Alyamani, E. J.; Tawfik, E. A. Preparation and Evaluation of Benzalkonium Chloride Hand Sanitizer as a Potential Alternative for Alcohol-Based Hand Gels. *Saudi Pharm. J.* 2021, 29 (8), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.06.002>.
- (64) Hakimi, A. A.; Armstrong, W. B. Hand Sanitizer in a Pandemic: Wrong Formulations in the Wrong Hands. *J. Emerg. Med.* 2020, 59 (5), 668–672. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2020.07.018>.
- (65) Vicuña, A. PRODUCTORA DE GEL ANTIBACTERIAL PARA MANOS A BASE DE LIMÓN (Citrus Aurantifolia). 2018.
- (66) Luis, F.; Moncayo, G. Recomendaciones Para La Elaboración de Preparaciones Alcohólicas Para La Antisepsia de Manos. *Minist. Salud Argentina* 2020.
- (67) Jairoun, A. A.; Al-Hemyari, S. S.; Shahwan, M. The Pandemic of COVID-19 and Its Implications for the Purity and Authenticity of Alcohol-Based Hand Sanitizers: The Health Risks Associated with Falsified Sanitizers and Recommendations for Regulatory and Public Health Bodies. *Res. Soc. Adm. Pharm.* 2021, 17 (1), 2050–2051. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.04.014>.
- (68) Kampf, G. Efficacy of Ethanol against Viruses in Hand Disinfection. *J. Hosp. Infect.* 2018, 98 (4), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.08.025>.
- (69) Products, A.; Version, G. ILIADe 143: 2021 | CLEN Method. 2021, No. February.
- (70) Ketrin, R.; Handayani, E. M.; Komalasari, I. Bracketing Method with Certified Reference Materials for High Precision and Accuracy Determination of Trace Cadmium in Drinking Water by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry. *AIP Conf. Proc.* 2017, 1803 (August). <https://doi.org/10.1063/1.4973185>.
- (71) Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M.; Bosque-Sendra, J. M. Calibration in Chemical Measurement Processes. II. A Methodological Approach. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2001, 20 (11), 620–636. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00111-X).
- (72) Shimatzu. Application News. *Shimatzu Appl. News* 2020, No. AD-0223, 3. [https://doi.org/10.1016/s0969-4765\(08\)70090-0](https://doi.org/10.1016/s0969-4765(08)70090-0).
- (73) Bedner, M.; Murray, J. A.; Urbas, A. A.; Maccreehan, W. A.; Wilson, W. B. A Comparison of Measurement Methods for Alcohol-Based Hand Sanitizers. *Natl. Inst. Stand. Technol.* 2021, 1–56.
- (1) Torrance, G. W. Utility Approach to Measuring Health-Related Quality of Life. *J. Chronic Dis.* 1987, 40 (6), 593–600. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90019-1).

- (2) Hao, Y. J.; Wang, Y. L.; Wang, M. Y.; Zhou, L.; Shi, J. Y.; Cao, J. M.; Wang, D. P. The Origins of COVID-19 Pandemic: A Brief Overview. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022, *69* (6), 3181–3197. <https://doi.org/10.1111/tbed.14732>.
- (3) Bixby, L. R. Método Para La Estimación de La Tasa R de Covid-19 (Documento En Revisión). 2021, *19*, 1–3.
- (4) United Nations. Covid-19 and the Need for Action on Mental Health. *United Nations Policy Br.* 2020, 1–17.
- (5) Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* 2020, *87* (4), 281–286. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6>.
- (6) Hillier, M. D. Using Effective Hand Hygiene Practice to Prevent and Control Infection. *Nurs. Stand.* 2020, *35* (5), 45–50. <https://doi.org/10.7748/ns.2020.e11552>.
- (7) Gobierno de Costa Rica. Reglamento Técnico RTCR 501:2020 Productos Cosméticos, Alcohol En Gel Para Manos. Especificaciones y Requisitos Para El Registro Sanitario. Sistema Costarricense de Información Jurídica: Costa Rica 2020.
- (8) Inteco. Inte Q185:2020 - Determinación Del PH En Alcohol En Gel. Método de Ensayo. 2020, No. 506.
- (9) Inteco. Inte Q184:2020 - Determinación Del Grado Alcohólico En Alcohol En Gel. Método de Ensayo. 2020, No. 506.
- (10) ISO. ISO Guide 35:2017. 2017, 2017.
- (11) Zhou, P.; Yang, X. Lou; Wang, X. G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H. R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C. L.; Chen, H. D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R. Di; Liu, M. Q.; Chen, Y.; Shen, X. R.; Wang, X.; Zheng, X. S.; Zhao, K.; Chen, Q. J.; Deng, F.; Liu, L. L.; Yan, B.; Zhan, F. X.; Wang, Y. Y.; Xiao, G. F.; Shi, Z. L. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* 2020, *579* (7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- (12) World Health Organization (WHO). WHO statement on novel coronavirus in Thailand.
- (13) World Health Organization (WHO). Timeline: WHO’s COVID-19 response.
- (14) Mendez, A. El Desempleo Preocupa a La Ciudadanía Más Que El COVID-19. 2020, p 4.
- (15) Ferretti, L.; Wymant, C.; Kendall, M.; Zhao, L.; Nurtay, A.; Abeler-Dörner, L.; Parker, M.; Bonsall, D.; Fraser, C. Quantifying SARS-CoV-2 Transmission Suggests Epidemic Control with Digital Contact Tracing. *Science* (80-.). 2020, *368* (6491), 1–13. <https://doi.org/10.1126/science.abb6936>.
- (16) Kratzel, A.; Kratzel, A.; Todt, D.; V'kovski, P.; V'kovski, P.; Steiner, S.; Steiner, S.; Gultom, M.; Gultom, M.; Thao, T. T. N.; Thao, T. T. N.; Ebert, N.; Ebert, N.; Holwerda, M.; Holwerda, M.; Steinmann, J.; Steinmann, J.; Niemeyer, D.; Dijkman, R.; Dijkman, R.; Kampf, G.; Drosten, C.; Steinmann, E.; Thiel, V.; Thiel, V.; Pfaender, S. Inactivation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 by WHO-Recommended Hand Rub Formulations and Alcohols. *Emerg. Infect. Dis.* 2020, *26* (7), 1592–1595. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200915>.
- (17) Neeltje van Doremalen, P.; Infectious, (National Institute of Allergy and; Diseases); Trenton Bushmaker, B. S. N. I. of A. and; Diseases); Dylan H. Morris, M. P. (Princeton U. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 2020, 0–2.
- (18) Berardi, A.; Perinelli, D. R.; Merchant, H. A.; Bisharat, L.; Basheti, I. A.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G. F. Hand Sanitisers amid CoViD-19: A Critical Review of Alcohol-Based Products on the Market and Formulation Approaches to Respond to Increasing Demand. *Int. J. Pharm.* 2020, *584* (April), 119431. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119431>.
- (19) World Health Organization (WHO). Guide to Local Production: WHO-Recommended Handrub Formulations Introduction: 2020, No. April, 9.
- (20) Dear, K.; Grayson, L.; Nixon, R. Potential Methanol Toxicity and the Importance of Using a Standardised Alcohol-Based Hand Rub Formulation in the Era of COVID-19. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2020, *9* (1), 10–12. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00788-5>.
- (21) Nexstar Media Wire. More Products Added to FDA Hand Sanitizer Recall List. *Fox News.* 2020, p 2.
- (22) La Gaceta. Reglamento Del Órgano de Reglamentación Técnica N°32068. 2002.
- (23) INTECO. INTE/ISO Guía 33:2017. 2017, No. 506.
- (24) Zúñiga, S. M. R.; Solano, J. C. *Certificación de Un Material de Referencia de Dicromato de Potasio Para La Calibración de Espectrofotómetros Ultravioleta Visible*; 2002.

- (25) Calderón, B.; Molina, G.; Lois, M.; Vargas, A.; Soto, J. *Material de Referencia de Leche En Polvo y Su Empleo En Rondas Interlaboratoriales Para Alimentos: Homogeneidad e Incertidumbre.*; 2014.
- (26) Molina, G. Implementación de Una Metodología Para El Estudio de La Homogeneidad y La Estabilidad En El Desarrollo de Un Material de Referencia de Cadmio, Plomo y Cromo En Disolución Acuosa Para Un Ensayo de Aptitud. 2013.
- (27) Jiménez, L. Sistemas de Medición y Aseguramiento Metrológico. Normalización y Metrología. 2007, 80.
- (28) Marcos Casquero, M. del C. Acercamiento a La Metrología. *Aldaba* 1984, No. 2, 123–131. <https://doi.org/10.5944/aldaba.2.1984.19515>.
- (29) Robert, A.; Rasch, F. Conceptos Básicos de Metrología Industrial. 1–7.
- (30) Vicente, P.; Ginés, S. Integración de Máquinas Medidoras Por Coordenadas En Entornos CAD/CAM. *Univ. Politécnica Cart.* 2005, 1–7.
- (31) Marbán, R.; Pellecer, J. *Metrología Para No-Metrólogos*; 2002.
- (32) Metrology, T. De; Redgrave, F. Metrología Abreviada. 2008, 85.
- (33) JCGM. Vocabulario Internacional de Metrología: Conceptos Fundamentales, Generales y Términos Asociados. *Cent. Español Metrol.* 2012, 3 (2), 88. <https://doi.org/10.1021/ja01341a021>.
- (34) Esquivel, A. E. *Metrología y Sus Aplicaciones*, Primera Ed.; México, 2014.
- (35) Escamilla Esquivel, A. *Metrología y Sus Aplicaciones.*; 2000.
- (36) Caixeiro, J. M. R.; Souza, V. De; Silva, R. A. L.; Bandeira, R. D. C. C.; Valente, L. A. N. Material De Referencia Certificado – Etanol En Agua Certified Reference Materials - Ethanol in Water. 1–10.
- (37) INTECO. INTE/ISO Guía 30:2017. 2017, 1–40.
- (38) Schmid, W. A.; Lazos Martínez, R. J. Guide to Estimate the Measurement Uncertainty. *Natl. Cent. Metrol. Mex.* 2000, 27.
- (39) 2008, J. 100: Guía Para La Expresión de La Incertidumbre de Medida. *La, B., Iso, N. (n.d.). Doc. los procedimientos técnicos y Organ. un Lab. Metrol. presión bajo la norma iso/iec 17025 1. Técnica, N. (2008). Iso-9001-2008-Icontec. (571). Prim. (2008). JCGM 1012008 Evaluación 2014, 79 (1), 20–50.*
- (40) Pérez, M. del M. Estimación de Incertidumbres. Guía GUM. *Rev. Española Metrol.* 2012, 114,130.
- (41) Pauwels, J.; Lamberty, A.; Schimmel, H. Homogeneity Testing of Reference Materials. *Accredit. Qual. Assur.* 1998, 3 (2), 51–55. <https://doi.org/10.1007/s007690050186>.
- (42) Linsinger, T. P. J.; Pauwels, J.; Van Der Veen, A. M. H.; Schimmel, H.; Lamberty, A. Homogeneity and Stability of Reference Materials. *Accredit. Qual. Assur.* 2001, 6 (1), 20–25. <https://doi.org/10.1007/s007690000261>.
- (43) Arvizu Torres, M. del R.; Valle Moya, E.; Reyes del Valle, A. Estudios de Estabilidad En Materiales de Referencia Certificados En Matriz Acuosa Empleando El Método de Pérdidas de Transpiración. *Simp. Metrol.* 2010, 1–9.
- (44) Pauwels, A. L. H. S. J. The Study Of The Stability Of Reference Materials. 1998, 359–361.
- (45) Eurachem. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*; 1998.
- (46) Klinkenberg, A.; Zuiderweg, F. J. Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography. *Chem. Eng. Sci.* 1956, 5 (6), 271–289. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(56\)80003-1](https://doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1).
- (47) Guiochon, G. A. Chromatography, Today and Tomorrow. *Anal. Chim. Acta* 1993, 283 (1), 309–319. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85237-E](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)85237-E).
- (48) Rahman, M. M.; Abd El-Aty, A. M.; Choi, J.-H.; Shin, H.-C.; Shin, S. C.; Shim, J.-H. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Anal. Sep. Sci.* 2015, 823–834. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep024>.
- (49) Holler, J.; Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*; 2015; Vol. 5.
- (50) Yagües, G. V. Cromatografía de Gases. *Cromatografía* 2008, 1–19.
- (51) Hage, D. S. *Chromatography*; 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>.
- (52) Middlehurst, J.; Kennett, B. Flame Ionization Detectors. *J. Chromatogr. A* 1963, 10 (C), 294–302. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)92312-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)92312-x).
- (53) Tobergte, D. R.; Curtis, S. Estudio Comparativo Del Proceso de Corrosión En Recubrimiento Cerámicos. Metálicos y Orgánicos Mediante Técnicas Electroquímicas. *J. Chem. Inf. Model.* 2013,

- 53 (9), 1689–1699.
- (54) AOAC. Percentages by Volume at 60F of Ethyl Alcohol Corresponding to Apparent Specific Gravity. 2005, 16–34.
 - (55) Webb, P. a. Volume and Density Determinations for Particle Technologists. *Society* 2001, No. February, 1–16.
 - (56) Medina, V. A. S. Estudio de La Temperatura, Humedad Relativa, Presión y Densidad Como Variables de Influencia Para La Medición de Tensión Superficial de Líquidos. 2013, 1–21.
 - (57) ISO. ISO 15212-1: Oscillation-Type Density Meters - Part 1: Laboratory Instruments. 1998, No. 1, 11.
 - (58) Paar, A. Instruction Manual DMA 4100 M DMA 4500 M DMA 5000 M. 2012, 152.
 - (59) Mettler Toledo. De Picnómetros e Hidrómetros a Densímetros Digitales.
 - (60) Daomin Zhou, D. *Microelectrodes for In-Vivo Determination of PH*; Elsevier Inc., 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50012-X>.
 - (61) Makarychev-mikhailov, S.; Shvarev, A.; Bakker, E. *New Trends in Ion-Selective Electrodes*; Elsevier Inc., 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373738-0.50006-4>.
 - (62) Cleal, M.; Gibbon, A.; Fontana, B. D.; Parker, M. O. The Importance of PH: How Aquarium Water Is Affecting Behavioural Responses to Drug Exposure in Larval Zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2020, *199* (July), 173066. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173066>.
 - (63) Aodah, A. H.; Bakr, A. A.; Booq, R. Y.; Rahman, M. J.; Alzahrani, D. A.; Alsulami, K. A.; Alshaya, H. A.; Alsuabeyl, M. S.; Alyamani, E. J.; Tawfik, E. A. Preparation and Evaluation of Benzalkonium Chloride Hand Sanitizer as a Potential Alternative for Alcohol-Based Hand Gels. *Saudi Pharm. J.* 2021, *29* (8), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.06.002>.
 - (64) Hakimi, A. A.; Armstrong, W. B. Hand Sanitizer in a Pandemic: Wrong Formulations in the Wrong Hands. *J. Emerg. Med.* 2020, *59* (5), 668–672. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2020.07.018>.
 - (65) Vicuña, A. PRODUCTORA DE GEL ANTIBACTERIAL PARA MANOS A BASE DE LIMÓN (Citrus Aurantifolia). 2018.
 - (66) Luis, F.; Moncayo, G. Recomendaciones Para La Elaboración de Preparaciones Alcohólicas Para La Antisepsia de Manos. *Minist. Salud Argentina* 2020.
 - (67) Jairoun, A. A.; Al-Hemyari, S. S.; Shahwan, M. The Pandemic of COVID-19 and Its Implications for the Purity and Authenticity of Alcohol-Based Hand Sanitizers: The Health Risks Associated with Falsified Sanitizers and Recommendations for Regulatory and Public Health Bodies. *Res. Soc. Adm. Pharm.* 2021, *17* (1), 2050–2051. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.04.014>.
 - (68) Kampf, G. Efficacy of Ethanol against Viruses in Hand Disinfection. *J. Hosp. Infect.* 2018, *98* (4), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.08.025>.
 - (69) Products, A.; Version, G. ILIADe 143 : 2021 | CLEN Method. 2021, No. February.
 - (70) Ketrin, R.; Handayani, E. M.; Komalasari, I. Bracketing Method with Certified Reference Materials for High Precision and Accuracy Determination of Trace Cadmium in Drinking Water by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry. *AIP Conf. Proc.* 2017, *1803* (August). <https://doi.org/10.1063/1.4973185>.
 - (71) Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M.; Bosque-Sendra, J. M. Calibration in Chemical Measurement Processes. II. A Methodological Approach. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2001, *20* (11), 620–636. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00111-X).
 - (72) Shimatzu. Application News. *Shimatzu Appl. News* 2020, No. AD-0223, 3. [https://doi.org/10.1016/s0969-4765\(08\)70090-0](https://doi.org/10.1016/s0969-4765(08)70090-0).
 - (73) Bedner, M.; Murray, J. A.; Urbas, A. A.; Maccreehan, W. A.; Wilson, W. B. A Comparison of Measurement Methods for Alcohol-Based Hand Sanitizers. *Natl. Inst. Stand. Technol.* 2021, 1–56.

Anexos

Cuadro A 1: Resultados obtenidos de las masas y concentraciones de disoluciones madre y patrones para el análisis. Mediciones a 20 °C, balones de 25.00 mL.

Disolución Madre	Masa MRC (g)	Masa butanol (g)	Masa líquida (g)	Concentración (%) *
DM1	7,6569	No aplica	23,5870	31,03
Patrón	Masa DM1 (g)	Masa butanol (g)	Masa líquida (g)	Concentración (%) *
G1	0,2847	0,7935	24,8136	0,36
G2	0,8913	0,7997	24,7777	1,12
G3	1,5043	0,7989	24,7427	1,89
G4	2,1215	0,8014	24,7239	2,66

*Fracción en masa expresada como porcentaje.

Cuadro A 2: Señales del equipo obtenidas para cada patrón preparado en la determinación del parámetro de linealidad y LC/LD en la validación del método por GC FID.

Patrón	Concentración (% m/m)	Razón de áreas	$x_i - x_{prom}$	$(x_i - x_{prom})^2$	$y_i - y_{prom}$	$(y_i - y_{prom})^2$	$(x_i - x_{prom})(y_i - y_{prom})$	x_i^2	\hat{y}	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$
G1	0.3561	0.0741	-1.1495	1.3213	-0.2508	0.0629	0.2883	0.1268	0.0721	0.0019	0.0000
G1	0.3561	0.0743	-1.1495	1.3213	-0.2505	0.0628	0.2880	0.1268	0.0721	0.0022	0.0000
G1	0.3561	0.0738	-1.1495	1.3213	-0.2511	0.0630	0.2886	0.1268	0.0721	0.0017	0.0000
G1	0.3561	0.0736	-1.1495	1.3213	-0.2513	0.0631	0.2889	0.1268	0.0721	0.0015	0.0000
G2	1.1164	0.2358	-0.3892	0.1515	-0.0891	0.0079	0.0347	1.2462	0.2393	-0.0035	0.0000
G2	1.1164	0.2365	-0.3892	0.1515	-0.0883	0.0078	0.0344	1.2462	0.2393	-0.0028	0.0000
G2	1.1164	0.2348	-0.3892	0.1515	-0.0901	0.0081	0.0351	1.2462	0.2393	-0.0045	0.0000
G2	1.1164	0.2365	-0.3892	0.1515	-0.0884	0.0078	0.0344	1.2462	0.2393	-0.0028	0.0000
G3	1.8868	0.4095	0.3813	0.1454	0.0846	0.0072	0.0322	3.5600	0.4087	0.0007	0.0000
G3	1.8868	0.4113	0.3813	0.1454	0.0864	0.0075	0.0329	3.5600	0.4087	0.0026	0.0000
G3	1.8868	0.4092	0.3813	0.1454	0.0843	0.0071	0.0321	3.5600	0.4087	0.0004	0.0000
G3	1.8868	0.4102	0.3813	0.1454	0.0853	0.0073	0.0325	3.5600	0.4087	0.0015	0.0000
G4	2.6630	0.5790	1.1574	1.3396	0.2541	0.0646	0.2941	7.0913	0.5794	-0.0004	0.0000
G4	2.6630	0.5816	1.1574	1.3396	0.2567	0.0659	0.2971	7.0913	0.5794	0.0022	0.0000
G4	2.6630	0.5772	1.1574	1.3396	0.2523	0.0636	0.2920	7.0913	0.5794	-0.0022	0.0000
G4	2.6630	0.5809	1.1574	1.3396	0.2560	0.0655	0.2963	7.0913	0.5794	0.0015	0.0000
Suma	24.0887	5.1982	0.0000	11.8309	0.0000	0.5722	2.6016	48.0975	5.1982	0.0000	0.0001
Promedio	1.5055	0.3249									
b	a	r	r²	S_b	S_a	S_{y/x}	t_(n-2)	t*Sa	t*Sb	LC	LD
0.2199	-0.0062	0.9999	0.9998	6.6E-04	1.4E-02	0.0023	2.1199	0.0289	1E-03	0.1039	0.0312

Cuadro A 3: Resultados obtenidos de las masas y concentraciones de disoluciones madre y patrones para el análisis de veracidad. Mediciones a 20°C, balones de 25.00 mL.

Disolución Madre	Masa MRC (g)	Masa butanol (g)	Masa líquida (g)	Concentración (%) *
DM2	7,7785	No aplica	23,7137	31.36
Patrón	Masa DM1 (g)	Masa butanol (g)	Masa líquida (g)	Concentración (%) *
R2	1.5643	0,8010	24,7707	1.98

Cuadro A 4: Señales del equipo obtenidas para el patrón R2 en la determinación del parámetro de veracidad en la validación del método por GC FID.

Patrón	Réplica	Área EtOH	Área ButOH	Razón de Áreas	Interpolación (%)	Dilución 1 (%)	Resultado (%)	Valor MRC (%)	Sesgo (%)	Sesgo promedio (%)
R2	1	1149394	2622883	0.4382	2.021	32.003	97.564	95.6	-2.054	-1.764
	2	1299428	2963750	0.4384	2.022	32.019	97.613	95.6	-2.105	
	3	1192414	2720674	0.4383	2.021	32.007	97.577	95.6	-2.068	
	4	1490875	3438658	0.4336	2.000	31.667	96.542	95.6	-0.985	
	5	1401225	3203170	0.4374	2.018	31.947	97.395	95.6	-1.877	
	6	1082814	2488732	0.4351	2.007	31.777	96.876	95.6	-1.335	
	7	1354301	3111394	0.4353	2.008	31.790	96.917	95.6	-1.377	
	8	1192659	2714737	0.4393	2.026	32.082	97.807	95.6	-2.309	

Cuadro A 5: Resultados del análisis de R2 para diferentes días, utilizando misma metodología y equipo. Para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.

Réplica	Día		
	1	2	3
1	95.118	95.470	95.843
2	95.710	95.008	95.891
3	95.291	95.730	95.856
4	94.949	94.952	94.839
5	95.195	94.863	95.677
6	95.531	95.179	95.167
7	95.578	95.441	95.207
8	95.743	96.473	96.082
Promedio	95.390	95.390	95.570

Cuadro A 6: Suma y Varianza entre y dentro de los grupos, derivados del ANOVA. Para el método de cuantificación de etanol por GC-FID.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza
Entre grupos	0.23	2	0.12
Dentro de los grupos	3.91	21	0.19

Total	4.14	23	0.32
-------	------	----	------

Cuadro A 7: Parámetros estadísticos del ANOVA utilizados para el cálculo de las repetibilidades. Para el método de cuantificación de etanol por *GC-FID*.

Análisis de varianza entre grupos	
Parámetro estadístico	Resultados
Número de réplicas	8
S^2_d	0.120
S^2_L	0.01
Repetibilidad %DSRr	0.452
Precisión intermedia %DSRR	0.462

Cuadro A 8: Señales del equipo obtenidas para el patrón R2 en la determinación del parámetro de precisión intermedia en la validación del método por *GC FID*. Día 1.

Patrón	Réplica	Área EtOH	Área ButOH	Razón de Áreas	Interpolación (%)	Dilución 1 (%)	Resultado corregido (%)
R2	1	1499273	3618349	0.4144	1.882	29.802	95.118
	2	1386496	3325399	0.4169	1.894	29.988	95.710
	3	1523427	3669936	0.4151	1.885	29.856	95.291
	4	1507809	3645418	0.4136	1.879	29.749	94.949
	5	1526104	3680090	0.4147	1.884	29.826	95.195
	6	1516846	3644881	0.4162	1.890	29.931	95.531
	7	1429497	3433277	0.4164	1.891	29.946	95.578
	8	1192659	2714737	0.4393	2.026	32.082	95.743

Cuadro A 9: Señales del equipo obtenidas para el patrón R2 en la determinación del parámetro de precisión intermedia en la validación del método por *GC FID*. Día 2.

Patrón	Réplica	Área EtOH	Área ButOH	Razón de Áreas	Interpolación (%)	Dilución 1 (%)	Resultado corregido (%)
R2	1	1531785	3699346	0.4141	1.889	29.912	95.470
	2	1520515	3690369	0.4120	1.880	29.767	95.008
	3	1437977	3463170	0.4152	1.894	29.994	95.730
	4	1493325	3626559	0.4118	1.879	29.750	94.952
	5	1464490	3559939	0.4114	1.877	29.722	94.863
	6	1445371	3501557	0.4128	1.883	29.821	95.179
	7	1505825	3637793	0.4139	1.888	29.903	95.441
	8	1341163	3204630	0.4185	1.909	30.227	96.473

Cuadro A 10: Señales del equipo obtenidas para el patrón R2 en la determinación del parámetro de precisión intermedia en la validación del método por *GC FID*. Día 3.

Patrón	Réplica	Área EtOH	Área ButOH	Razón de Áreas	Interpolación (%)	Dilución 1 (%)	Resultado (%)
--------	---------	-----------	------------	----------------	-------------------	----------------	---------------

R2	1	1149394	2622883	0.4382	2.021	32.003	95.843
	2	1299428	2963750	0.4384	2.022	32.019	95.891
	3	1192414	2720674	0.4383	2.021	32.007	95.856
	4	1490875	3438658	0.4336	2.000	31.667	94.839
	5	1401225	3203170	0.4374	2.018	31.947	95.677
	6	1082814	2488732	0.4351	2.007	31.777	95.167
	7	1354301	3111394	0.4353	2.008	31.790	95.207
	8	1192659	2714737	0.4393	2.026	32.082	96.082

Cuadro A 11: Cálculo de incertidumbre para el aporte por repetibilidad, para la validación de metodologías por GC-FID.

Descripción	s	n	μ repetibilidad
Repetibilidad	0.683081944	3	0.39

Cuadro A 12: Cálculo de incertidumbre para el aporte por dilución #1, para la validación de metodologías por GC-FID.

Descripción	Masa vacío (g)	Masa lleno (g)	Diferencia (g)	μ calibración	μ resolución	μ estándar	μ dilución
Masa líquida	20.9767	45.7474	24.7707	0.000065	2.88675E-05	0.0001	0.0002
Masa alícuota	30.551	32.1153	1.5643	0.000060	2.88675E-05	0.0001	

Cuadro A 13: Cálculo de incertidumbre para el aporte por dilución #2, para la validación de metodologías por GC-FID.

Descripción	Masa vacío (g)	Masa lleno (g)	Diferencia (g)	μ calibración	μ resolución	μ estándar	μ dilución
Masa Total	31.844	55.5577	23.7137	0.00007	2.88675E-05	0.0002	0.0002
Masa MRC	41.1209	48.8994	7.7785	0.00007	2.88675E-05	0.0002	

Cuadro A 14: Cálculo de incertidumbre para el aporte por regresión y MRC, para la validación de metodologías por GC-FID.

Descripción	$S_{x/y}$	A_x	p	N	X_o	X_p	Q_{xx}	μ estándar	μ combinada
μx_o	0.0023	0.2199	1	8	2.015	1.5055	11.8309	0.01114	0.950
μ MRC								0.950	

Cuadro A 15: Señales del equipo obtenidas para el patrón R4 en la determinación del parámetro de veracidad en la validación del método por FTIR.

Patrón	Réplica	Absorbancia	Interpolación (%)	Concentración diluida (%)	Resultado (%)	Valor MRC (%)	Sesgo (%)	Sesgo promedio (%)
R2	1	0.069	11.418	30.265	92.265	95.600	3.488	-4.55
	2	0.067	11.084	29.379	89.565	95.600	6.312	
	3	0.069	11.418	30.265	92.265	95.600	3.488	
	4	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	5	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	6	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	7	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	8	0.069	11.418	30.265	92.265	95.600	3.488	

Cuadro A 16: Señales del equipo obtenidas para el patrón R4 en la determinación del parámetro de veracidad en la validación del método por FTIR, patrón preparado mismo día.

Patrón	Réplica	Absorbancia	Interpolación (%)	Concentración diluida (%)	Resultado (%)	Valor MRC (%)	Sesgo (%)	Sesgo promedio (%)
--------	---------	-------------	-------------------	---------------------------	---------------	---------------	-----------	--------------------

R2	1	0.0550	9.4255	31.3090	96.4469	95.6	-0.886	0.605
	2	0.0540	9.2513	30.7302	94.6641	95.6	0.979	
	3	0.0530	9.0771	30.1515	92.8813	95.6	2.844	
	4	0.0540	9.2513	30.7302	94.6641	95.6	0.979	
	5	0.0550	9.4255	31.3090	96.4469	95.6	-0.886	

Cuadro A 17: Resultados del análisis de R2 para diferentes días, utilizando misma metodología y equipo. Para el método de cuantificación de etanol por FTIR.

Réplica	Día		
	1	2	3
1	92.265	92.913	91.115
2	89.565	90.100	91.115
3	92.265	92.913	91.115
4	90.915	91.506	89.657
5	90.915	91.506	89.657
6	90.915	91.506	88.200
7	90.915	91.506	89.657
8	92.265	92.913	91.115
Promedio	91.253	91.858	90.204

Cuadro A 18: Suma y Varianza entre y dentro de los grupos, derivados del ANOVA. Para el método de cuantificación de etanol por FTIR.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza
Entre grupos	11.20	2	5.60
Dentro de los grupos	21.53	21	1.03
Total	32.73	23	6.63

Cuadro A 19: Parámetros estadísticos del ANOVA utilizados para el cálculo de las repetibilidades. Para el método de cuantificación de etanol por FTIR.

Análisis de varianza entre grupos	
Parámetro estadístico	Resultados
Número de réplicas	8
S^2_d	5.60
S^2_L	0.57
Repetibilidad %DSRr	1.11
Precisión intermedia %DSRR	1.39

Cuadro A 20: Señales del equipo obtenidas para el patrón R4 en la determinación del parámetro de precisión en la validación del método por FTIR. Día 1.

Patrón	Réplica	Absorbancia	Interpolación (%)	Concentración diluida (%)	Resultado (%)	Valor MRC (%)	Sesgo (%)	Sesgo promedio (%)
R2	1	0.069	11.418	30.265	92.265	95.600	3.488	-4.55
	2	0.067	11.084	29.379	89.565	95.600	6.312	
	3	0.069	11.418	30.265	92.265	95.600	3.488	
	4	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	5	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	6	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	7	0.068	11.251	29.822	90.915	95.600	4.900	
	8	0.069	11.418	30.265	92.265	95.600	3.488	

Cuadro A 21: Señales del equipo obtenidas para el patrón R4 en la determinación del parámetro de precisión en la validación del método por FTIR. Día 2.

Patrón	Réplica	Absorbancia	Interpolación (%)	Concentración diluida (%)	Resultado (%)	Valor MRC (%)	Sesgo (%)	Sesgo promedio (%)
R2	1	0.069	11.498	30.477	92.913	95.600	2.811	-4.55
	2	0.067	11.150	29.554	90.100	95.600	5.753	
	3	0.069	11.498	30.477	92.913	95.600	2.811	
	4	0.068	11.324	30.016	91.506	95.600	4.282	
	5	0.068	11.324	30.016	91.506	95.600	4.282	
	6	0.068	11.324	30.016	91.506	95.600	4.282	
	7	0.068	11.324	30.016	91.506	95.600	4.282	
	8	0.069	11.498	30.477	92.913	95.600	2.811	

Cuadro A 22: Señales del equipo obtenidas para el patrón R4 en la determinación del parámetro de precisión en la validación del método por FTIR. Día 3.

Patrón	Réplica	Absorbancia	Interpolación (%)	Concentración diluida (%)	Resultado (%)	Valor MRC (%)	Sesgo (%)	Sesgo promedio (%)
R2	1	0.067	11.276	29.887	91.115	95.600	4.692	5.64
	2	0.067	11.276	29.887	91.115	95.600	4.692	
	3	0.067	11.276	29.887	91.115	95.600	4.692	
	4	0.066	11.096	29.409	89.657	95.600	6.216	
	5	0.066	11.096	29.409	89.657	95.600	6.216	
	6	0.065	10.915	28.931	88.200	95.600	7.741	
	7	0.066	11.096	29.409	89.657	95.600	6.216	
	8	0.067	11.276	29.887	91.115	95.600	4.692	

Cuadro A 23: Cálculo de incertidumbre estándar para el aporte por repetibilidad, para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	s	n	μ repetibilidad
Repetibilidad	0.95444273	8	0.34

Cuadro A 24: Cálculo de incertidumbre estándar para el aporte por concentración DM1, para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	Masa MRC	μ Masa MRC	Masa balón	μ masa balón	Valor MRC	μ MRC	Masa total	μ Masa T	μ diferencia masas	μ DM1
DM1	48.0794	0.0001	40.4225	0.0001	95.6	1.9	31.0340	0.0001	0.00014	0.30839

Cuadro A 25: Cálculo de incertidumbre estándar para el aporte por concentración de F1, para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	Masa DM1	μ masa DM1	Masa balón	μ masa balón	Cn DM1	μ DM1	Masa total	μ Masa total	μ diferencia masas	μ F1
F1	18.5681	0.0001	15.8154	0.0001	31.0340	0.3083	21.669	0.0001	0.0001414	0.0862

Cuadro A 26: Cálculo de incertidumbre estándar para el aporte por concentración de F2, para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	Masa DM1	μ masa DM1	Masa balón	μ masa balón	Cn DM1	μ DM1	Masa total	μ Masa total	μ diferencia masas	μ F2
F2	18.5681	0.0001	15.7228	0.0001	31.0340	0.3083	21.5488	0.0001	0.00014	0.13

Cuadro A 27: Cálculo de incertidumbre estándar para el aporte por diferencia de absorbancias, para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	Mínima división	Factor	μ	$\mu \Delta$ Absorbancia
Δ Absorbancia	0.001	1.732	0.000578	0.00082

Cuadro A 28: Cálculo de incertidumbre estándar para el aporte por el valor de k , para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	F2	μ F2	F1	μ F1	Δ Absorbancia	$\mu \Delta$ Absorbancia	valor de k	μ diferencia de F	μk
k	13.6567	0.1357	8.6788	0.0862	0.0298	0.000816	167.0440	0.1608	7.07

Cuadro A 29: Cálculo de incertidumbre combinada para la validación de metodologías por FTIR.

Descripción	Valor μ relativa	μ Combinada	U Expandida	Aporte (%)
μk	0.00370	1.62	3.2	17.44
μ Dilución 1	0.00007			0.35
μ Dilución 2	0.00007			0.33
μF_1	0.01737			81.88

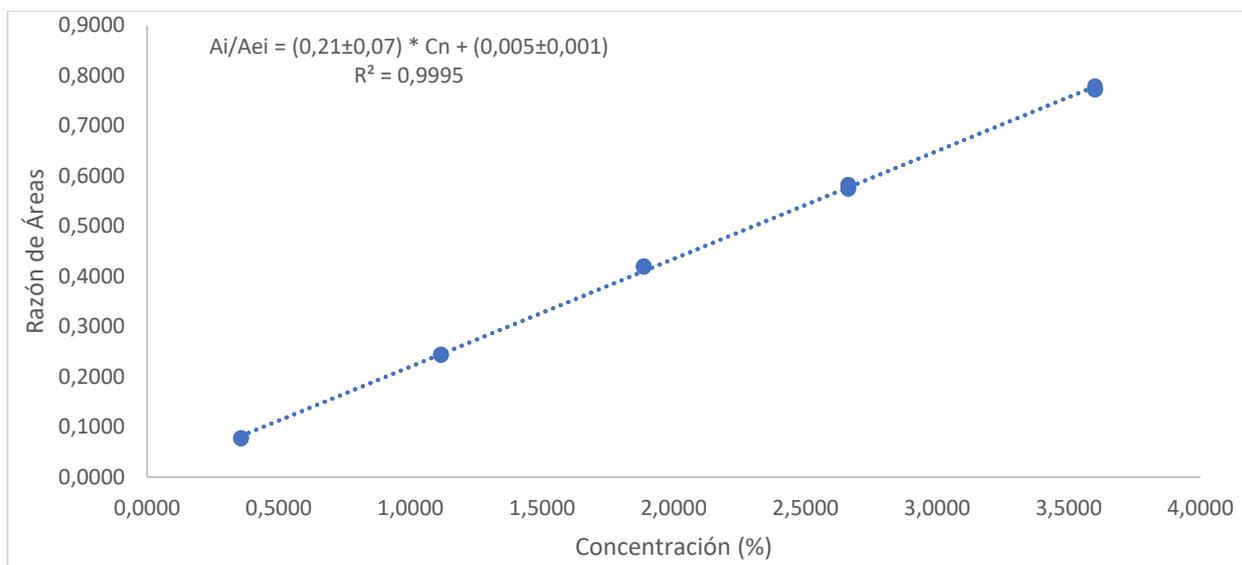


Figura A 1: Curva de calibración utilizada para la cuantificación de etanol en las muestras del CMR utilizadas para la caracterización. Caracterización mediante GC-FID. Elaboración propia.

Cuadro A 30: Botellas con su código asignado y resultados obtenidos del equipo para la caracterización del contenido alcohólico mediante GC-FID.

Botella	Código	Réplica	Concentración (%)	U, k=2 (±, %)
14	C1	1	61.0	2.4
		2	62.1	2.4
29	C2	1	60.6	2.4
		2	60.0	2.4
21	C3	1	61.1	2.4
		2	61.7	2.4
38	C4	1	61.8	2.4
		2	61.2	2.4
57	C5	1	61.1	2.4
		2	61.8	2.4
60	C6	1	62.5	2.4
		2	62.7	2.4
Promedio			61.5	2.4
Desviación Estándar			0.8	

Cuadro A 31: Resultados detallados obtenidos del equipo para la caracterización del contenido alcohólico mediante GC-FID.

Código Botella	Razón de Áreas	Interpolación (%)	Dilución 1 (%)	Resultado final corregido (%)
C1.1	0.4157	1.9111	31.3527	61.0
C1.2	0.5134	2.3659	38.9065	62.1
C2.1	0.4075	1.8731	31.0518	60.6
C2.2	0.4314	1.9840	31.8772	60.0
C3.1	0.4216	1.9386	31.7418	61.1
C3.2	0.3886	1.7848	29.6803	61.7
C4.1	0.4952	2.2810	37.6582	61.8
C4.2	0.4695	2.1617	35.0893	61.2

C5.1	0.4637	2.1344	35.1755	61.1
C5.2	0.4725	2.1756	36.1125	61.8
C6.1	0.4027	1.8505	30.5849	62.5
C6.2	0.3929	1.8051	29.9950	62.7

Cuadro A 32: Resultados obtenidos de las destilaciones para la caracterización del contenido alcohólico mediante GC-FID.

Botella	Réplica	Masa balón destilación vacío (g)	Masa balón de destilación lleno (g)	Masa balón aforado vacío (g)	Masa balón aforado lleno (g)	Masa muestra (g)	Masa destilado (g)
C1	1	120.5850	170.3074	70.8412	165.0779	49.7224	94.2367
	2	120.5871	180.2226	70.2012	163.2850	59.6355	93.0838
C2	1	120.5817	169.9038	69.2788	163.7447	49.3221	94.4659
	2	120.5875	171.3269	56.8265	151.0430	50.7394	94.2165
C3	1	120.5889	170.3950	55.3994	149.6466	49.8061	94.2472
	2	120.5900	167.0981	55.9747	150.7793	46.5081	94.8046
C4	1	120.5862	178.7023	70.2011	163.5188	58.1161	93.3177
	2	120.5974	175.7410	69.2834	163.0309	55.1436	93.7475
C5	1	120.5895	175.9128	70.8424	164.4531	55.3233	93.6107
	2	120.5887	176.6211	55.9757	149.5586	56.0324	93.5829
C6	1	120.5891	167.9228	56.8272	151.4438	47.3337	94.6166
	2	120.5899	166.9552	55.4034	150.2006	46.3653	94.7972

Cuadro A 33: Resultados obtenidos de las diluciones para la caracterización del contenido alcohólico mediante GC-FID.

Botella	Réplica	Masa vacío (g)	Masa con agua (g)	Masa etOH (g)	Masa butOH (g)	Masa Lleno (g)	Masa Líquida (g)	Masa etanol (g)	Masa butanol (g)
C1	1	20.5161	25.2012	26.7061	27.5184	45.2043	24.6882	1.5049	0.8123
	2	31.8439	43.7194	45.2192	46.0256	56.5072	24.6633	1.4998	0.8064
C2	1	30.8394	35.7061	37.1940	38.0042	55.5055	24.6661	1.4879	0.8102
	2	20.8648	26.8792	28.4167	29.2285	45.5683	24.7035	1.5375	0.8118
C3	1	20.5285	25.4862	26.9924	27.8069	45.1899	24.6614	1.5062	0.8145
	2	20.3610	25.6240	27.1097	27.9056	45.0674	24.7064	1.4857	0.7959
C4	1	30.8477	35.0372	36.5313	37.3363	55.5149	24.6672	1.4941	0.8050
	2	31.8379	36.3789	37.8944	38.7012	56.4381	24.6002	1.5155	0.8068
C5	1	20.5200	25.8845	27.3848	28.2018	45.2452	24.7252	1.5003	0.8170
	2	31.8377	35.2621	36.7494	37.5662	56.5256	24.6879	1.4873	0.8168
C6	1	20.5264	27.0109	28.5081	29.3086	45.2726	24.7462	1.4972	0.8005
	2	20.8653	25.1134	26.6085	27.4012	45.7090	24.8437	1.4951	0.7927

Cuadro A 34: Resultados obtenidos de las destilaciones para la caracterización del contenido alcohólico mediante densimetría, réplica 1. Estudios de homogeneidad entre botellas.

Orden	Masa balón vacío (g)	Masa balón lleno (g)	Masa balón colector vacío (g)	Masa balón colector lleno (g)	Masa muestra (g)	Masa líquida (g)
H1	120.5906	175.0390	55.3577	149.3754	54.4484	94.0177
H2	120.5910	170.6089	59.8307	154.2294	50.0179	94.3987
H3	116.2427	169.6691	59.8231	154.1932	53.4264	94.3701
H4	116.2413	166.2470	55.3728	149.7509	50.0057	94.3781
H5	120.5905	170.6152	59.6795	154.0637	50.0247	94.3842
H6	116.2440	166.2312	70.2102	164.4046	49.9872	94.1944

H7	116.2430	166.2587	71.2226	165.5952	50.0157	94.3726
H8	120.5914	170.6015	70.9736	164.5458	50.0101	93.5722
H9	120.5883	170.6496	54.9808	149.3769	50.0613	94.3961
H10	120.5871	170.4472	71.2235	165.5525	49.8601	94.3290
H11	116.2408	166.2222	54.9920	149.3588	49.9814	94.3668
H12	116.2433	166.2773	69.8915	164.3129	50.0340	94.4214

Cuadro A 35: Resultados obtenidos de las destilaciones para la caracterización del contenido alcohólico mediante densimetría, réplica 2. Estudios de homogeneidad entre botellas.

Orden	Masa balón vacío (g)	Masa balón lleno (g)	Masa balón colector vacío (g)	Masa balón colector lleno (g)	Masa muestra (g)	Masa líquida (g)
H1	116.2438	166.2479	56.8263	150.9063	50.0041	94.0800
H2	116.2462	166.2589	55.8527	150.1028	50.0127	94.2501
H3	120.5950	170.6719	70.2036	164.4830	50.0769	94.2794
H4	120.5918	170.3940	55.9749	150.0655	49.8022	94.0906
H5	116.2459	166.3707	54.9991	149.2639	50.1248	94.2648
H6	116.2422	166.2246	69.3599	164.0756	49.9824	94.7157
H7	120.5921	170.7132	69.0369	163.3514	50.1211	94.3145
H8	120.591	171.5541	58.7484	153.0012	50.9631	94.2528
H9	116.251	166.3044	69.2813	163.5157	50.0534	94.2344
H10	120.5915	170.6191	54.9901	149.3869	50.0276	94.3968
H11	120.6152	170.6844	70.9689	165.2638	50.0692	94.2949
H12	116.2424	166.3652	54.9773	149.4805	50.1228	94.5032

Cuadro A 36: Valor de concentración de etanol promedio obtenida para las mediciones expresado como porcentaje fracción en masa para las muestras destiladas de H1-H12 por duplicado, mediante densimetría.

Botella	Muestra	Réplica	Concentración (%)	U, k=2 (\pm , %)
5	H1	1	63.35	1.2
		2	63.30	1.2
19	H2	1	63.06	1.3
		2	62.32	1.3
20	H3	1	62.72	1.2
		2	61.78	1.2
22	H4	1	62.88	1.3
		2	63.48	1.3
34	H5	1	61.99	1.2
		2	62.58	1.2
41	H6	1	62.68	1.3
		2	61.07	1.3
47	H7	1	62.61	1.2
		2	62.73	1.2
58	H8	1	61.99	1.3
		2	60.81	1.3
61	H9	1	62.57	1.2
		2	62.97	1.2
63	H10	1	62.30	1.3
		2	62.20	1.3
66	H11	1	63.15	1.2
		2	62.68	1.2

68	H12	1	62.12	1.3
		2	62.33	1.3
Promedio (%)			62.5	1.3
Desviación Estándar (%)			0.65	

Cuadro A 37: Valor de pH obtenido para las mediciones para las muestras de H1-H12 por duplicado, con su incertidumbre de medición.

Muestra	Réplica	pH	U, k=2 (±)
H1	1	7,705	0.025
	2	7,675	0.023
H2	1	7,695	0.025
	2	7,685	0.023
H3	1	7,695	0.025
	2	7,715	0.023
H4	1	7,565	0.025
	2	7,545	0.023
H5	1	7,595	0.025
	2	7,555	0.023
H6	1	7,615	0.025
	2	7,575	0.023
H7	1	7,745	0.025
	2	7,735	0.023
H8	1	7,755	0.025
	2	7,725	0.023
H9	1	7,695	0.025
	2	7,735	0.023
H10	1	7,555	0.025
	2	7,605	0.023
H11	1	7,735	0.025
	2	7,685	0.023
H12	1	7,745	0.025
	2	7,715	0.023
Promedio		7,669	0.025
Desviación Estándar		0.071	

Cuadro A 38: Resultados obtenidos del equipo para la determinación del contenido alcohólico para estudios de estabilidad mediante GC-FID.

Código Botella	Razón de Áreas	Interpolación (%)	Dilución 1 (%)	Resultado final corregido (%)
E1.1	0.4332	1.9652	32.1563	60.4
E1.2	0.4274	1.9400	32.0458	60.2
E2.1	0.4282	1.9432	32.0374	60.5
E2.2	0.4346	1.9718	32.2551	60.6
E3.1	0.4105	1.8652	30.7993	58.1
E3.2	0.4180	1.8981	31.6632	59.1
E4.1	0.4227	1.9190	31.7755	59.8
E4.2	0.4300	1.9512	31.7457	60.2
E5.1	0.4385	1.9890	32.1885	60.5

E5.2	0.4250	1.9294	31.8112	59.9
E6.1	0.4293	1.9483	32.1358	60.7
E6.2	0.4480	2.0308	32.4862	61.6
E7.1	0.4224	1.9177	31.4498	59.5
E7.2	0.4240	1.9250	31.7051	60.2
E8.1	0.4170	1.8939	31.3856	59.4
E8.2	0.4033	1.8336	30.0279	56.9

Cuadro A 39: Resultados obtenidos de las destilaciones para la determinación del contenido alcohólico para estudios de estabilidad mediante GC-FID y densimetría.

Botella	Réplica	Masa balón destilación vacío (g)	Masa balón de destilación lleno (g)	Masa balón aforado vacío (g)	Masa balón aforado lleno (g)	Masa muestra (g)	Masa destilado (g)
E1	1	116.2417	166.2620	69.2811	163.5503	50.0203	94.2692
	2	120.5917	170.6121	70.9171	165.2487	50.0204	94.3316
E2	1	120.5863	170.5884	69.9707	164.5799	50.0021	94.6092
	2	116.2424	166.3373	58.9752	153.2259	50.0949	94.2507
E3	1	120.5938	170.6004	71.3533	166.0011	50.0066	94.6478
	2	116.2433	166.2651	69.8938	163.6032	50.0218	93.7094
E4	1	116.2433	166.2776	55.9752	150.3753	50.0343	94.4001
	2	120.5918	170.6361	68.4249	163.6735	50.0443	95.2486
E5	1	116.2442	166.2562	69.2813	163.4457	50.0120	94.1644
	2	120.5922	170.6807	71.3539	165.6327	50.0885	94.2788
E6	1	120.5946	170.6278	69.0385	163.2950	50.0332	94.2565
	2	116.2499	166.2623	55.9727	150.2887	50.0124	94.3160
E7	1	116.2447	166.2598	70.9179	165.0968	50.0151	94.1789
	2	120.5923	170.8348	59.9053	154.907	50.2425	95.0017
E8	1	120.5919	170.6599	70.3678	164.7248	50.0680	94.3570
	2	116.2438	166.2890	69.8954	164.4915	50.0452	94.5961

Cuadro A 40: Resultados obtenidos de las diluciones para la determinación del contenido alcohólico para estudios de estabilidad mediante GC-FID.

Botella	Réplica	Masa vacío (g)	Masa con agua (g)	Masa etOH (g)	Masa butOH (g)	Masa Lleno (g)	Masa Líquida (g)	Masa etanol (g)	Masa butanol (g)
E1	1	20.8650	25.8524	27.3641	36.7030	45.6002	24.7352	1.5117	0.8050
	2	25.5128	32.1389	33.6385	34.4437	50.2833	24.7705	1.4996	0.8052
E2	1	31.8388	37.7098	39.2079	40.0099	56.5378	24.6990	1.4981	0.8020
	2	26.3049	36.1698	37.6797	38.4883	51.0045	24.6996	1.5099	0.8086
E3	1	20.4703	30.0102	31.5069	32.3199	45.1841	24.7138	1.4967	0.8130
	2	24.7356	32.0906	33.5844	34.3849	49.6542	24.9186	1.4938	0.8005
E4	1	24.6801	33.0483	34.5459	35.3553	49.4777	24.7976	1.4976	0.8094
	2	31.8382	38.7171	40.2322	41.0415	56.4880	24.6498	1.5151	0.8093
E5	1	31.8379	37.3364	38.8578	39.6644	56.4593	24.6214	1.5214	0.8066
	2	26.3037	33.2137	34.7125	35.5124	51.0148	24.7111	1.4988	0.7999
E6	1	25.5123	35.0892	36.5931	37.3945	50.3182	24.8059	1.5039	0.8014
	2	24.8533	32.3287	33.8730	34.6713	49.5574	24.7041	1.5443	0.7983
E7	1	31.8383	38.3951	39.8988	40.7165	56.4984	24.6601	1.5037	0.8177
	2	26.3038	30.5545	32.0598	32.8663	51.0959	24.7921	1.5053	0.8065

E8	1	25.5038	29.5337	31.0307	31.8343	50.3124	24.8086	1.4970	0.8036
	2	24.8616	31.3729	32.8823	33.6857	49.5800	24.7184	1.5094	0.8034

Cuadro A 41: Resultados obtenidos del pHmetro para la determinación del pH para los estudios de estabilidad.

Orden	Botella	Réplica	pH	U (±)
1	42	1	7,70	0.034
		2	7,74	0.034
2	50	1	7,78	0.034
		2	7,70	0.034
3	25	1	7,78	0.034
		2	7,67	0.034
4	24	1	7,68	0.034
		2	7,71	0.034
5	43	1	7,78	0.034
		2	7,71	0.034
6	18	1	7,80	0.034
		2	7,71	0.034
7	8	1	7,87	0.034
		2	7,66	0.034
8	70	1	7,65	0.034
		2	7,56	0.034
Promedio			7,72	0.034

DerSimonian-Laird

The consensus estimate is: 62.03
 The standard uncertainty is: 0.4969
 The 95% coverage interval ranges from: 61.06 to 63.01
 The dark uncertainty (tau) is: 0.2092

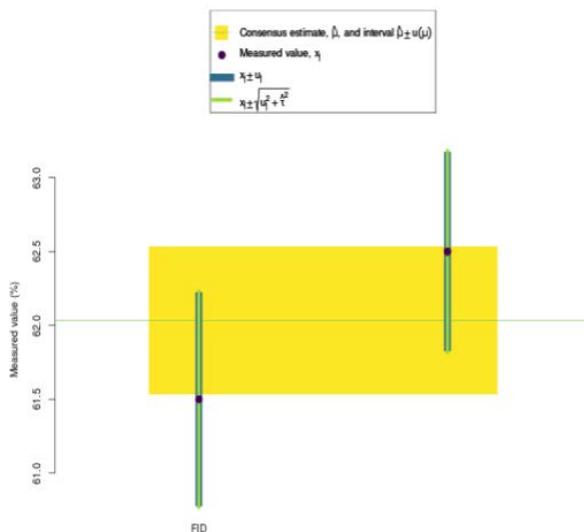


Figura A 2: Resumen obtenido del consensus builder del NIST para la combinación de los valores de caracterización de los métodos de GC-FID y densimetría.

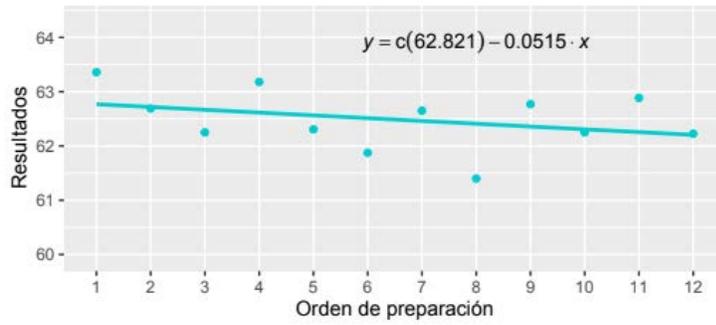


Figura A 3: Resultados obtenidos para el estudio de homogeneidad entre botellas, según de orden de preparación planteado. Estudio de homogeneidad entre botellas por densimetría. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

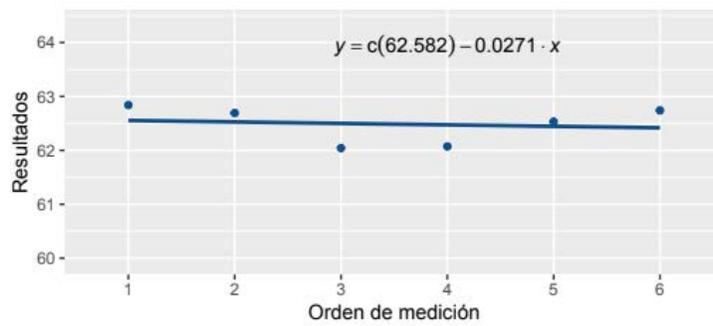


Figura A 4: Resultados obtenidos para el estudio de homogeneidad entre botellas, según de orden de medición planteado. Estudio de homogeneidad entre botellas por densimetría. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

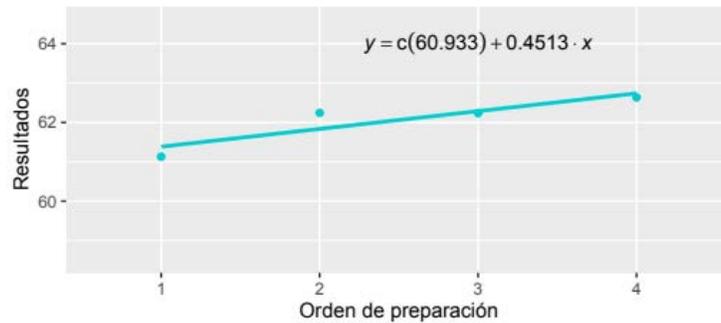


Figura A 5: Resultados obtenidos para el estudio de homogeneidad entre botellas, según de orden de preparación planteado. Estudio de homogeneidad entre botellas por densimetría. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

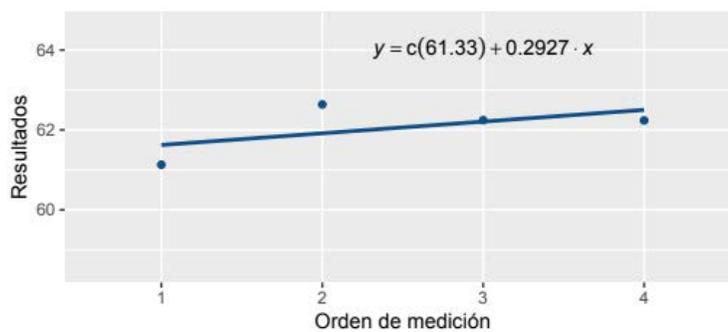


Figura A 6: Resultados obtenidos para el estudio de homogeneidad entre botellas, según de orden de medición planetado. Estudio de homogeneidad entre botellas por densimetría. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

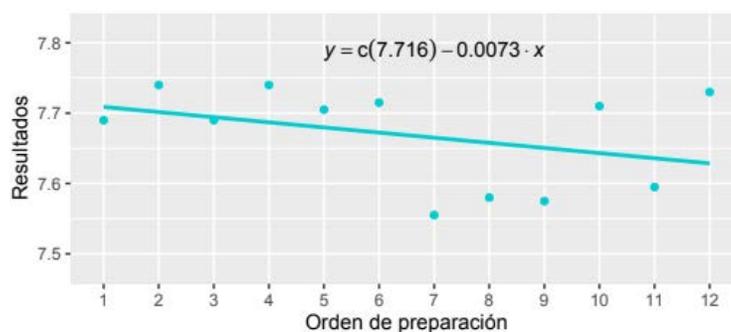


Figura A 7: Resultados obtenidos para el estudio de homogeneidad entre botellas, según de orden de preparación planetado. Estudio de homogeneidad entre botellas de pH. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

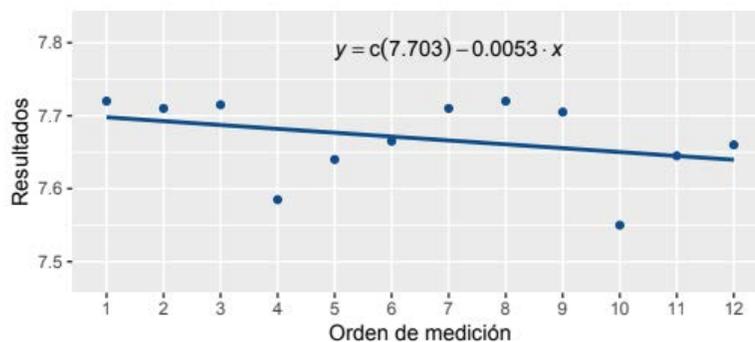


Figura A 8: Resultados obtenidos para el estudio de homogeneidad entre botellas, según de orden de medición planetado. Estudio de homogeneidad entre botellas de pH. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

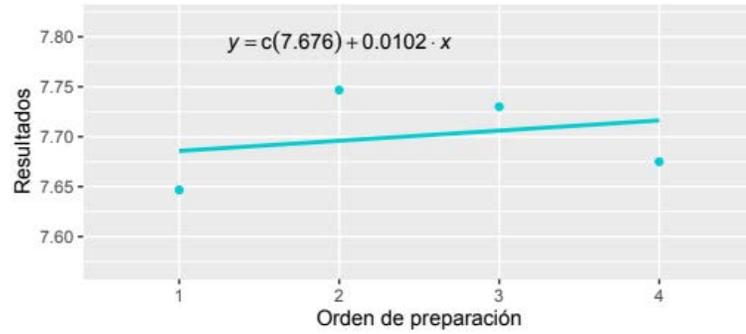


Figura A 9: Resultados de pH obtenidos para el estudio de homogeneidad dentro de botellas, según de orden de preparación planteado. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.

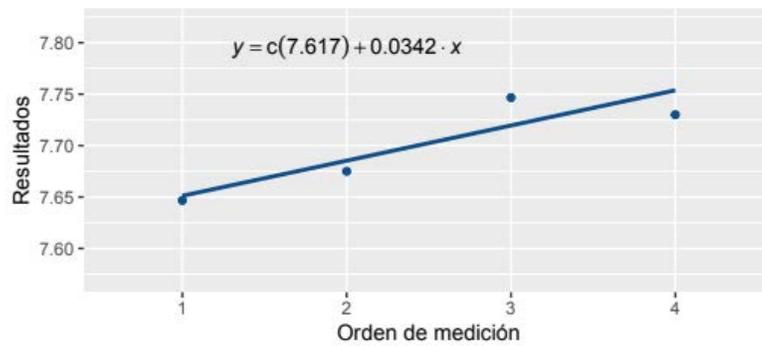


Figura A 10: Resultados de pH obtenidos para el estudio de homogeneidad dentro de botellas, según de orden de medición planteado. Elaboración del LCM, se adjunta para interpretación de resultados.