

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE CONCEPCIÓN – REY BALDUINO DE BÉLGICA

**DISEÑO DE UN PROCEDIMIENTO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN VINO: PROPUESTA
METODOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE FACTIBILIDAD EN EL
LABORATORIO.**

Trabajo de título para optar al título de
Ingeniería De Ejecución En Química
Mención Control.

Alumna:

Javiera Paola Melo Barra.

Profesor Guía:

Dr. Juan Pablo Inostroza Saldías



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): Memoria o trabajo de título; Tesis de Postgrado;

Título del trabajo: DISEÑO DE UN PROCEDIMIENTO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN VINO: PROPUESTA METODOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE FACTIBILIDAD EN EL LABORATORIO.

Nombre del candidato(a): Javiera Paola Melo Barra

Carrera / Grado: Ingeniería de Ejecución en Química Mención Control

Campus: Concepcion ; Departamento: Química y medio ambiente

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Juan Pablo Inostraza Saldías, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL

El trabajo **NO contiene información que amerite confidencialidad** y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por:

6 meses; 12 meses; 2 años; 3 años; 5 años; 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: _____ ; Firma: _____

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: _____ ; Firma: _____

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a cada una de las personas que estuvo en este proceso para mí y me dio todos los ánimos posibles para seguir adelante en cada momento de este largo camino, sin el apoyo de estas personas especiales nada sería posible.

RESUMEN

KEYWORDS: HPLC, ÁCIDOS ORGÁNICOS, VINO, VALIDACIÓN, PROCEDIMIENTO ANALÍTICO, ENOLOGÍA.

El presente trabajo de investigación se centra en el diseño de un procedimiento analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) orientado a la determinación de ácidos orgánicos en vinos. Estos compuestos poseen un rol fundamental en la composición química y sensorial del vino, influyendo en parámetros como la acidez, la frescura, la estabilidad microbiológica y la evolución del producto durante su almacenamiento. Por ello, su cuantificación precisa y confiable constituye un aspecto relevante tanto para el ámbito académico como para la industria vinícola, donde la calidad y el control de los procesos son prioritarios a la hora de elaborar el producto.

La propuesta metodológica surge de la necesidad de contar con un método analítico estandarizado y reproducible, que permita no solo identificar los ácidos orgánicos presentes en vinos tintos y blancos, que en este trabajo serán principalmente el ácido láctico, el ácido acético y el ácido cítrico, sino que también se evaluar la factibilidad de su implementación en un laboratorio universitario con recursos instrumentales limitados. A diferencia de procedimientos más complejos o costosos, este trabajo busca establecer un protocolo eficiente, aplicable y didáctico, que pueda servir como base para futuras investigaciones y prácticas de control de calidad en el área enológica dentro del laboratorio.

El diseño del procedimiento incluyó la selección de las condiciones cromatográficas más adecuadas, considerando variables como el tipo de columna, la fase móvil, el flujo, la temperatura y la longitud de onda de detección de los ácidos orgánicos estudiados. Paralelamente, se propuso un esquema de preparación de soluciones estándar y de curvas de calibración, con el fin de cubrir rangos de concentración representativos de los niveles habituales en vinos comerciales. A través de esta estrategia, se busca garantizar la sensibilidad y linealidad del método frente a distintos analitos de interés estudiados.

En términos de validación, el trabajo propuesto plantea la evaluación de parámetros esenciales, tales como: la linealidad, la precisión, la exactitud, la repetibilidad, los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ). Este enfoque permitirá determinar la factibilidad de aplicación y las condiciones críticas que deberían ser consideradas para una futura implementación práctica en el laboratorio.

Los resultados del análisis metodológico evidencian que el equipo HPLC constituye una técnica altamente versátil y robusta para el estudio de ácidos orgánicos en matrices complejas como el vino, además este trabajo busca aportar al ámbito enológico desde dos perspectivas complementarias. Por un lado, generando un aporte académico y formativo, al ofrecer una guía detallada que puede ser utilizada en asignaturas de análisis instrumental donde se vea el uso de equipos de alta resolución. Por otro lado, representa una contribución práctica a la industria vitivinícola, al proponer un procedimiento adaptable que permite mejorar el control de calidad de los vinos mediante la cuantificación confiable de compuestos clave para su perfil sensorial y estabilidad del producto final.

En conclusión, el diseño del procedimiento analítico desarrollado establece una base metodológica sólida para el análisis de ácidos orgánicos en vinos, combinando criterios de factibilidad, rigor científico y aplicabilidad práctica. Su implementación futura en laboratorio posibilitará validar experimentalmente las condiciones planteadas, abrir nuevas líneas de investigación en química enológica y fortalecer la vinculación entre el ámbito académico y productivo en la región vinícola.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos.....	3
ALCANCE	3
CAPÍTULO 1: DIAGNÓSTICO DE INFRAESTRUCTURA Y RECURSOS DE LABORATORIO	4
1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	4
1.1.1. Principios de separación.....	5
1.1.2. Principales componentes del HPLC	6
1.2. Diagnóstico de infraestructura previo a la implementación.....	9
1.2.1. Infraestructura física.....	10
1.2.2. Equipos e instrumental	10
1.2.3. Materiales y reactivos.....	13
1.2.4. Recursos tecnológicos y de soporte	14
1.2.5. Aspectos normativos y de seguridad.....	14
1.3. Contextualización de los ácidos orgánicos.....	14
1.3.1. Grupos carboxílicos.....	15
1.3.2. Ácido Láctico	16
1.3.3. Ácido Cítrico	16
1.3.4. Ácido Acético.....	17
1.4. Materiales y reactivos.....	18
1.4.1. Materiales y equipos.....	18
1.4.2. Reactivos y soluciones	18
1.5. Parámetros críticos para el análisis	19
1.5.1. Columna cromatográfica	20
1.5.2. Fase móvil	20
1.5.3. Flujo	21
1.5.4. Temperatura de la columna	22
1.5.5. Longitud de onda para la detección.....	23
1.5.6. Volumen de inyección.....	24

1.5.7.	Filtración y preparación de las muestras.....	24
1.6.	Evaluación de columna disponible	25
CAPÍTULO 2: DISEÑO DEL PROTOCOLO ANALÍTICO.....		26
2.1.	Procedimiento operativo estándar (SOP).....	26
2.1.1.	Reproducibilidad.....	26
2.1.2.	Trazabilidad.....	26
2.2.	Paso a paso del protocolo.....	27
2.2.1.	Selección de fase móvil.....	27
2.2.2.	Selección de detector y longitud de onda optima.....	28
2.2.3.	Inyección en el sistema cromatográfico.....	29
2.2.4.	Interpretación de resultados	29
2.3.	Preparación de estándares y matrices.....	30
2.3.1.	Preparación de los estándares.....	31
2.3.2.	Preparación de la matriz de vino.....	31
2.4.	Parámetros cromatográficos propuestos	31
2.4.1.	Columna.....	32
2.4.2.	Fase móvil.....	32
2.4.3.	Flujo	32
2.4.4.	Temperatura de columna.....	32
2.4.5.	Detector y condiciones de lectura	33
2.4.6.	Volumen de inyección.....	33
2.4.7.	Tiempo total de corrida	33
2.5.	Elaboración del SOP.....	33
2.6.	Comparación con otros protocolos (OIV y HPLC CON DAD)	34
2.6.1.	Comparación de fase móvil.....	35
2.6.2.	Comparación de columna cromatográfica	35
2.6.3.	Comparación de detector y longitud de onda.....	35
2.6.4.	Comparación en condiciones de flujo y temperatura.....	36
2.6.5.	Comparación en preparación de muestras y estándares.....	36
2.6.6.	Comparación en el tipo de elución.....	36
CAPÍTULO 3: PLAN DE VALIDACIÓN TEÓRICA.....		38
3.1.	Concepto de linealidad, precisión, exactitud, LOD, LOQ y robustez.....	38
3.1.1.	Linealidad.....	38

3.1.2.	Precisión	38
3.1.3.	Exactitud.....	39
3.1.4.	LOD y LOQ	41
3.1.5.	Robustez	42
3.1.6.	Indicadores claves de desempeño (KPI)	42
3.2.	Preparación de curvas de calibración	43
3.2.1.	Principio de la calibración.....	43
3.2.2.	Preparación de los estándares.....	43
3.2.3.	Rangos de trabajo	44
3.2.4.	Evaluación de la linealidad	44
3.2.5.	Aplicación de la curva de calibración	45
3.3.	Procedimiento para pruebas de robustez.....	45
3.3.1.	Parámetros a evaluar	45
3.3.2.	Procedimiento experimental.....	45
3.4.	Definición de rangos de concentración y criterios de aceptación	47
3.4.1.	Rangos de concentración.....	47
3.4.2.	Criterios de aceptación	47
3.5.	Recursos requeridos y costos asociados.....	48
3.5.1.	Recursos instrumentales y materiales	48
3.5.2.	Reactivos, solventes y estándares.....	49
3.5.3.	Recursos humanos y tiempos de corridas	50
3.5.4.	Costos indirectos y de mantenimiento	51
3.5.5.	Costo total y costo total real del análisis	51
3.6.	Tiempo de validación	52
3.6.1.	Preparación del protocolo.....	52
3.6.2.	Preparación de los estándares.....	53
3.6.3.	Verificación del equipo HPLC	53
3.6.4.	Selectividad de los analitos	53
3.6.5.	Rangos de concentración y linealidad.....	54
3.6.6.	Porcentaje de recuperación.....	54
3.6.7.	Análisis de precisión	55
3.6.8.	Confirmación de LOD y LOQ	55
3.6.9.	Plan de robustez	55

3.6.10.	Estabilidad de los estándares y las muestras	56
3.6.11.	Análisis de datos	56
3.6.12.	Repetición y acciones correctivas	56
3.6.13.	Tiempo total de validación.....	56
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		60
BIBLIOGRAFÍA Y FUENTES DE LA INFORMACIÓN		61
ANEXOS		65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Cromatógrafo líquido de alta resolución.....	5
Figura 1-2.	Depósito de fase móvil.....	7
Figura 1-3.	Sistema de bomba de alta presión.	7
Figura 1-4.	Puerto de inyección.	8
Figura 1-5.	Columna cromatográfica.	8
Figura 1-6.	Detector UV-Vis.....	8
Figura 1-7.	Software labsolution.....	9
Figura 1-9.	Detector DAD.....	12
Figura 1-10.	Detector RID.	13
Figura 1-11.	Columna SHIM-PACK SCR-101 H.	13
Figura 1-12.	Grupo carboxilos.	16
Figura 1-13.	Formación del ácido láctico.	16
Figura 1-14.	Ácido cítrico.....	17
Figura 1-15.	Formación del ácido acético.....	18
Figura 2-1.	SOP.....	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Recursos disponibles y requeridos para el análisis.....	19
Tabla 3-1.	KPI del análisis.....	42

Tabla 3-2. Rangos de trabajo.....	44
Tabla 3-3. Recursos instrumentales y materiales.	48
Tabla 3-4. Reactivos, solventes y estándares.	50
Tabla 3-5. Recursos Humanos y tiempos.....	50
Tabla 3-6. Costos indirectos.....	51

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

SIGLAS

CLP: Peso chileno

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta resolución

UV-VIS: Ultravioleta-visible

DAD: Detector de arreglo de diodos

RID: Detector de índice de refracción

MS: Espectrometría de masa

SHIM-PACK SCR-101 H: Columna de ácidos orgánicos

CV: Coeficiente de variación

KPI: Indicador Clave de Desempeño

EPP: Elementos de protección personal

OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino

SOP: Procedimiento operativo estándar

SD: Desviación estándar

LMP: Límite máximo permitido

%R: Porcentaje de recuperación

R²: Coeficiente de correlación

SIMBOLOGÍAS

mL: Mililitro

L: Litro

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

min: Minuto

mL/min: Mililitro por minuto

MPa: Mega pascal

°C: Grados Celsius

nm: Nanómetro

mm: Milímetro

COOH: Grupo carboxilos

C₃H₆O₃: Ácido láctico

CH₃COOH: Ácido acético

C₆H₈O₇: Ácido cítrico

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

H⁺: Protonada

INTRODUCCIÓN

El vino es una de las bebidas más antiguas y culturalmente significativas de la humanidad. Su producción, en los diversos continentes y con una amplia diversidad de variedades y estilos, representa no solo un pilar en la economía agrícola y agroindustrial, sino también un elemento de gran interés científico. La composición química del vino determina en gran medida sus características organolépticas, su estabilidad y su calidad final. Dentro de esta compleja matriz, los ácidos orgánicos desempeñan un papel fundamental, ya que inciden directamente en atributos como la acidez, la frescura, el balance gustativo y la estabilidad microbiológica del producto final.^[1]

Los ácidos presentes en el vino como el ácido cítrico, el ácido láctico y el ácido acético, que se originan a partir de la uva, mediante el metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica y de la acción bacteriana en la fermentación maloláctica.^[2] Su concentración y proporción relativa dependen de factores agronómicos (clima, suelo, madurez de la uva), tecnológicos (tipo de fermentación, uso de cultivos iniciadores, condiciones de crianza) y enológicos (prácticas de conservación y estabilización). En consecuencia, la determinación precisa de estos compuestos constituye un parámetro crítico en la evaluación de calidad y autenticidad del vino.^[3]

Desde el punto de vista enológico, la acidez total del producto y el perfil de ácidos orgánicos son indicadores de gran relevancia. El ácido láctico evidencia transformaciones metabólicas bacterianas; y el ácido acético es considerado un compuesto indeseable en altas concentraciones por estar asociado a defectos de calidad.^[4] Este conjunto de analitos ofrece información clave sobre el estado de almacenamiento, permitiendo a enólogos e investigadores tomar decisiones fundamentales desde el punto de vista técnico.

La determinación de ácidos orgánicos en matrices complejas como el vino plantea un desafío analítico debido a la necesidad de obtener resultados sensibles, específicos y reproducibles. Los métodos tradicionales, como la titulación ácido-base o la espectrofotometría, permiten estimar la acidez total del vino, pero carecen de la resolución necesaria para diferenciar entre los distintos ácidos presentes.^[5] En este contexto, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha consolidado como una técnica instrumental de elección, dado que ofrece alta precisión, separación eficiente de mezclas complejas y versatilidad en la detección.^[6]

El uso de HPLC para el análisis de ácidos orgánicos en vino se sustenta en varias ventajas metodológicas. Permite analizar simultáneamente múltiples compuestos en tiempos relativamente cortos. También, es compatible con diferentes detectores (UV, refractivo, conductimétrico), lo que amplía las posibilidades de aplicación según la disponibilidad de

recursos en cada laboratorio. Esta técnica se ajusta a los criterios de validación requeridos por normas nacionales e internacionales, lo que la convierte en un procedimiento confiable para laboratorios académicos, de investigación y de control de calidad en la industria vitivinícola.^[1]

Numerosos estudios han demostrado la eficacia del HPLC para la cuantificación de los ácidos orgánicos en vinos de diversas procedencias, estandarizando protocolos que consideran la preparación de muestras, la elección de fases móviles, la selección de columnas específicas y la construcción de curvas de calibración multicomponente.^[7] No obstante, llevar dichos procedimientos a laboratorios universitarios requiere adaptaciones prácticas, debido a las condiciones instrumentales, disponibilidad de reactivos y considerar objetivos formativos a los laboratorios especializados.

El trabajo propuesto tiene como objetivo el diseño y validación preliminar de un procedimiento por HPLC para la determinación de ácidos orgánicos en vinos, con un enfoque metodológico, formativo y teórico. La metodología se basó en una revisión y análisis crítico de literatura científica, normas técnicas y estudios previos, a partir de los cuales se propuso un protocolo adaptado a la realidad académica. Dicho protocolo contempla la selección de las condiciones cromatográficas, la preparación de soluciones estándar, la construcción de curvas de calibración y la evaluación teórica de parámetros críticos.^{[2][8]}

De esta forma, la investigación busca no solo aportar una herramienta técnica de utilidad para el análisis enológico, sino también contribuir a la formación académica y al fortalecimiento de la investigación dentro del laboratorio siendo aplicada en química instrumental. Asimismo, al establecer un procedimiento adaptable y factible, se abre la posibilidad de que el protocolo pueda ser implementado en futuros trabajos experimentales, llevando su aplicación al control de calidad de vinos producidos en la región y a la exploración de nuevas líneas de estudio en la química enológica.

Este trabajo contextualiza la relevancia de los ácidos orgánicos en el vino, la importancia de contar con métodos analíticos confiables para su determinación y la pertinencia de utilizar la cromatografía líquida de alta resolución como técnica instrumental de elección. Sobre esta base, se justifica la necesidad de desarrollar un procedimiento metodológico robusto, adaptable y formativo, que aporte tanto al ámbito académico como al productivo, y que represente un puente entre la teoría científica y la práctica enológica.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Diseñar un procedimiento analítico por HPLC para la determinación de ácidos orgánicos en vinos, considerando el diagnóstico de recursos disponibles en el laboratorio y la elaboración de un plan de validación teórico que garantice su factibilidad de implementación.

Objetivos específicos

1. Realizar un diagnóstico de infraestructura y recursos disponibles en el laboratorio (equipos, columnas, materiales y reactivos) para la implementación del método.
2. Diseñar un protocolo analítico propio adaptado a las condiciones del laboratorio, incluyendo la propuesta de SOP y flujos de trabajo.
3. Elaborar un plan de validación teórica considerando parámetros de linealidad, precisión, exactitud, LOD, LOQ y robustez, en base a guías internacionales.

ALCANCE

El presente trabajo se enfocará en el diseño y propuesta teórica de un método analítico por HPLC para la determinación de ácidos orgánicos, tales como el ácido acético, láctico y cítrico en vinos tintos y blancos, considerando el diagnóstico de recursos, la revisión bibliográfica, la creación de un protocolo adaptado, la validación teórica y el análisis ingenieril que abarque costos, riesgos, indicadores clave de desempeño (KPI) y mantenimiento, excluyendo la realización de corridas experimentales de HPLC y la validación práctica del método en muestras reales.

CAPÍTULO 1: DIAGNÓSTICO DE INFRAESTRUCTURA Y RECURSOS DE LABORATORIO

1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución se ha consolidado como una de las herramientas analíticas más relevantes en el ámbito del control de calidad, debido a que la investigación y la caracterización de compuestos presentes en alimentos y bebidas. Su capacidad para separar, identificar y cuantificar componentes en mezclas complejas la convierte en una técnica indispensable en laboratorios de análisis químico, tanto a nivel académico como industrial.^[9]

En el sector alimentario, el HPLC permite determinar con alta precisión compuestos de interés, tales como las vitaminas, los aminoácidos, los azúcares, los ácidos orgánicos y los polifenoles, así como detectar contaminantes, aditivos y residuos de pesticidas.^[10] La ventaja principal radica en su elevada sensibilidad y selectividad, lo que posibilita el análisis de componentes presentes incluso en concentraciones como traza. Además, el uso de detectores específicos como UV-Vis, el de arreglo de diodos (DAD) o fluorescencia amplía significativamente el rango de aplicaciones y la capacidad de identificación estructural.^[11]

En el caso particular de las bebidas, el HPLC se ha convertido en una herramienta esencial para el control de calidad de productos como los vinos, las cervezas, los jugos y las bebidas energéticas. En estas matrices, el análisis de ácidos orgánicos, azúcares y compuestos fenólicos permite evaluar la calidad sensorial, el grado de fermentación y la estabilidad del producto final.^[12] Por ejemplo, en la industria vitivinícola, la cuantificación de ácidos como el tartárico, málico, láctico y acético es fundamental para comprender los procesos fermentativos y asegurar la conformidad con normativas internacionales de calidad y seguridad alimentaria.^{[4][6]}

A un nivel metodológico, el HPLC ofrece una alta reproducibilidad y flexibilidad, permitiendo adaptar las condiciones cromatográficas, como la fase móvil, la columna, el flujo, la temperatura, entre otros a los requerimientos específicos del analito y la matriz que se desea estudiar y analizar. Esto resulta especialmente relevante en entornos universitarios o de investigación aplicada, donde las condiciones experimentales pueden variar según los recursos disponibles o los objetivos analíticos del estudio.^[13]

Concluyendo que el HPLC es considerado una herramienta fundamental para garantizar la calidad, la autenticidad y la seguridad de los alimentos y bebidas, además de contribuir al desarrollo de nuevas metodologías y la optimización de procesos productivos. Su implementación en laboratorios académicos no solo fortalece las capacidades analíticas disponibles, sino que también fomenta la formación de profesionales con competencias

técnicas avanzadas en química instrumental y control de calidad, alineándose con las exigencias actuales de la industria alimentaria y enológica.^[14]



Fuente: Jenck.[15]

Figura 1-1. Cromatógrafo líquido de alta resolución.

1.1.1. Principios de separación

Durante el análisis cromatográfico por HPLC, la muestra líquida previamente filtrada y, en algunos casos, diluida o tratada para eliminar interferencias en la lectura se introduce en el sistema mediante un inyector que permite dosificar un pequeño volumen de muestra en una corriente continua de fase móvil. Esta fase móvil, generalmente compuesta por uno o varios disolventes miscibles (como agua, metanol o ácido sulfúrico), que es impulsada a través del sistema por bombas que generan presiones elevadas, variadas entre 50 y 400 bar. Gracias a esta presión, la fase móvil circula a una velocidad constante por el interior de la columna cromatográfica, donde ocurre el proceso de separación de los componentes de la muestra analizada.^[1]

La fase móvil cumple una función esencial, debido a que esta actúa como vehículo que arrastra los analitos a lo largo de la columna. Al ingresar en ella, las moléculas de los distintos compuestos interactúan de manera diferencial con la fase estacionaria (material sólido o soporte que recubre el interior de la columna). Este material puede tener propiedades polares, apolares o iónicas, según el tipo de separación que se busque. En consecuencia, los analitos se adsorben y posteriormente se liberan de la fase estacionaria durante su trayecto, estableciendo un equilibrio dinámico entre las fases móvil y la fase estacionaria. La intensidad de estas interacciones depende de factores como la polaridad, el tamaño molecular, la carga eléctrica y la estructura química de cada compuesto.^[2]

Cada sustancia presenta un tiempo de retención característico, que corresponde al intervalo que este tarda en eluir desde el momento de la inyección hasta su detección. Este tiempo depende de la afinidad del analito con la fase estacionaria, los compuestos que presentan interacciones más fuertes con el material de la columna permanecen más tiempo retenidos, mientras que aquellos con menor afinidad eluyen rápidamente. Además, la

composición de la fase móvil influye de manera significativa, debido a que pequeñas variaciones en su polaridad, fuerza iónica o pH pueden modificar el equilibrio de adsorción-liberación y, por tanto, el orden de elución.^{[1][2]}

En el caso particular del análisis de ácidos orgánicos, se emplean comúnmente las columnas de intercambio iónico, como la SHIM-PACK SCR-101H, que contienen una resina sulfonada capaz de interactuar con las especies presentes en la muestra. Estas columnas están diseñadas para separar compuestos con grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) mediante mecanismos basados en el intercambio iónico y en la exclusión por tamaño. Dado que los ácidos orgánicos son moléculas que pueden ionizarse en solución acuosa acidificadas, su comportamiento cromatográfico depende fuertemente del pH de la fase móvil.^[1]

Por esta razón, se utiliza habitualmente una fase móvil ácida, como una solución diluida de ácido sulfúrico (H_2SO_4), la cual mantiene las especies en su forma protonada y reduce la competencia entre los iones del analito y los de la fase móvil. Este medio ácido también ayuda a estabilizar el pH dentro de la columna utilizada, garantizando una mejor reproducibilidad de los tiempos de retención y evitando la disociación excesiva de los ácidos carboxílicos.^[2] El uso de H_2SO_4 diluido, genera un entorno ideal para la separación eficiente de ácidos como el cítrico, láctico y acético, los cuales son de gran interés en matrices alimentarias como el vino.

Finalmente, los compuestos separados son detectados mediante un detector adecuado, generalmente de índice de refracción (RID) o de conductividad, debido a que muchos ácidos orgánicos no presentan cromóforos que absorban en el rango UV-visible. La combinación de una columna de intercambio iónico y una fase móvil ácida permite obtener una separación selectiva, reproducible y cuantitativa de los ácidos orgánicos, proporcionando información fundamental para evaluar la calidad, estabilidad y características enológicas del vino.^{[1][2]}

1.1.2. Principales componentes del HPLC

- a) Depósito de fase móvil: Contiene el o los solventes que transportan la muestra a través del equipo. En análisis de ácidos orgánicos se utilizan soluciones acuosas débilmente ácidas, que ayudan a mantener los compuestos ionizados de forma estable.



Fuente: Labster theory page.[16]

Figura 1-2. Depósito de fase móvil.

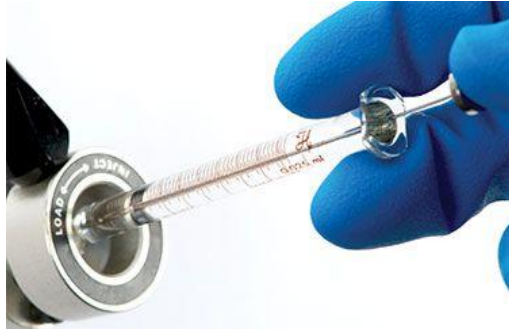
- b) Bomba de alta presión: Esta parte del equipo genera un flujo constante y controlado de la fase móvil. Su función es vital, debido a que garantiza la reproducibilidad del tiempo de retención y la precisión en la cuantificación. Las bombas isocráticas mantienen una composición fija de fase móvil, mientras que las bombas gradientes permiten variar su composición durante el análisis.



Fuente: Cromtek.[17]

Figura 1-3. Sistema de bomba de alta presión.

- c) Inyector: En esta parte se introduce un volumen exacto de muestra que normalmente se encuentra entre 10 y 50 μL en la corriente de la fase móvil. Los tipos de inyector pueden ser tanto manual como automatizado mediante un autosampler.



Fuente: Sugelabor.[18]

Figura 1-4. Puerto de inyección.

- d) Columna cromatográfica: Esta parte es considerado el corazón del equipo, debido a que es donde ocurre la separación de los analitos. Está rellena con partículas de sílicas modificadas o resinas de intercambio iónico.



Fuente: Cromlab instrument.[19]

Figura 1-5. Columna cromatográfica.

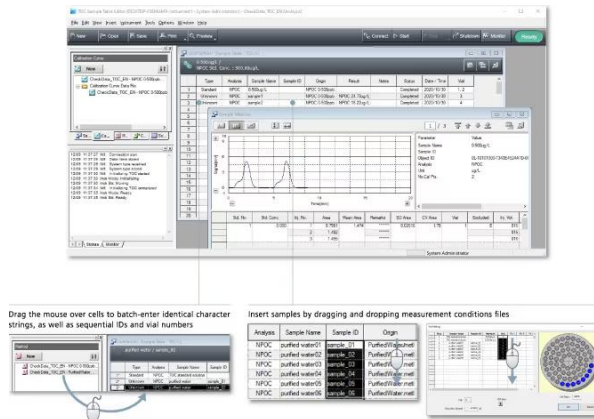
- e) Detector: Los detectores son los que registran los cambios en la composición del efluente que sale de la columna. Comúnmente para este tipo de análisis se emplean detectores RID o UV-Vis, dependiendo del tipo de compuesto y su absorbancia. Cada pico obtenido en el cromatograma corresponde a un analito, cuya área se relaciona directamente con su concentración.



Fuente: Labconsort.[20]

Figura 1-6. Detector UV-Vis.

- f) Sistema de adquisición y procesamiento de los datos: Se refiere al software asociado que registra el cromatograma, permite el tratamiento de los datos obtenidos y que calcula automáticamente las concentraciones mediante curvas de calibración guardadas dentro del sistema.



Fuente: Shimadzu.[21]

Figura 1-7. Software labsolution.

1.2. Diagnóstico de infraestructura previo a la implementación

El diagnóstico de la infraestructura previo a la implementación es una etapa fundamental en el diseño de cualquier método analítico, debido a que nos permite evaluar la disponibilidad, la adecuación y las condiciones de los recursos necesarios para la ejecución del procedimiento. Esta evaluación inicial asegura que el laboratorio cuente con las capacidades físicas, instrumentales, humanas y tecnológicas requeridas, así minimizando los riesgos y optimizando la calidad de los resultados.

Para este análisis de ácidos orgánicos en vinos mediante HPLC, realizar este diagnóstico es crucial por varias razones, debido a que necesitamos garantizar la factibilidad de la técnica que se quiere implementar y para eso debemos verificar que el laboratorio disponga de un sistema de HPLC adecuado al análisis, columnas compatibles, detectores, bombas, software que nos permitan realizar la separación y cuantificación de los ácidos orgánicos presentes en las muestras de vinos.

Asimismo, un diagnóstico previo nos ayuda a contribuir a la seguridad y al cumplimiento normativo, debido a que así se lograra identificar riesgos potenciales en el laboratorio, tales como el manejo de solventes orgánicos, verificar que la ventilación sea suficiente, ver que las condiciones eléctricas no sean inadecuadas o que el almacenamiento de los reactivos sea el adecuado, garantizando así el cumplimiento de las normas de seguridad química, ambiental y laboral.

Además de evaluar los conocimientos técnicos de las personas que realizaran el análisis propuesto, asegurando que las personas que operen tengan los conocimientos necesarios para manejar el HPLC, sepan preparar soluciones estándar y procesar los datos. De esta manera, un diagnóstico completo asegura que los recursos disponibles sean compatibles

con los requerimientos del método propuesto, impactando directamente en la reproducibilidad, precisión y exactitud de los resultados, siendo los aspectos claves en un estudio enológico y de control de calidad.

En conjunto, el diagnóstico de infraestructura previo a la implementación de un método constituye una etapa estratégica y fundamental que permite anticipar limitaciones, optimizar recursos y establecer un plan seguro y eficiente para la ejecución del análisis, siendo la base sobre la cual se diseñara el protocolo analítico y se garantizara la fiabilidad de los resultados en la determinación de ácidos orgánicos en vinos.

1.2.1. Infraestructura física

El laboratorio cuenta con condiciones adecuadas para el desarrollo de análisis cromatográficos de ácidos orgánicos en vinos, incluyendo áreas independientes para la preparación de muestras y soluciones necesarias para el análisis, superficies resistentes a solventes y control ambiental de temperatura para asegurar la reproducibilidad de las corridas cromatográficas.^{[1][2]}

El espacio dispone de ventilación y campanas de extracción adecuadas para minimizar la exposición a vapores orgánicos, iluminación suficiente y una distribución funcional del mobiliario, así favoreciendo la seguridad y eficiencia del trabajo analítico. El acceso controlado al área donde se realizará el análisis protege la trazabilidad y evita contaminaciones cruzadas.^[4]

1.2.2. Equipos e instrumental

El laboratorio dispone de un sistema HPLC completo con bomba isocrática, inyector manual, detector UV-Vis, DAD y RID, además de un software de adquisición y procesamiento de datos, apto para la cuantificación de ácidos orgánicos tales como el ácido acético, el ácido láctico y el ácido cítrico en vinos.^{[6][7][9]}

- a) Bomba isocrática: Una bomba isocrática es un componente esencial en los sistemas HPLC que mantiene un flujo constante de fase móvil con una composición fija a través de la columna durante todo el análisis. Su objetivo principal es garantizar que los analitos se eluyan bajo condiciones uniformes, lo que facilita la reproducibilidad de los tiempos de retención y la cuantificación precisa. Además de estar diseñada para minimizar pulsaciones lo que asegura un

flujo estable y una línea base de detector suave, lo cual es crucial para medir correctamente la concentración de compuestos como los ácidos orgánicos.

Para este análisis se utiliza una bomba isocrática, con un sistema de bomba de alta presión como se puede apreciar en la figura 1-3.

- b) Inyector manual: El inyector manual es un dispositivo esencial que permite introducir un volumen preciso de muestra que se desea analizar en la fase móvil que fluye hacia la columna. Su principio operativo se basa en el uso de una jeringa de precisión conectada al inyector y un bucle de muestra integrado en una válvula de seis vías. En la posición de carga, la muestra llena el bucle sin mezclarse aún con la fase móvil, cuando se gira la válvula a la posición de inyección, el bucle se conecta al flujo de la fase móvil, permitiendo que la muestra sea arrastrada hacia la columna.



Fuente: Indiamart.[22]

Figura 1–8. Inyector manual shimadzu.

- c) Detector UV-Vis: El detector UV-Vis es uno de los detectores más utilizados en HPLC debido a su capacidad para identificar y cuantificar analitos basándose en su absorción de luz a longitudes de onda específicas, debido a que cada compuesto químico posee un espectro de absorción característico en la región ultravioleta (200–400 nm) o visible (400–700 nm), lo que permite diferenciar y medir los analitos que salen de la columna. En su principio operativo, la fase móvil que contiene los analitos pasa por una celda de flujo transparente a la luz UV-Vis, donde una fuente de luz, típicamente lámparas de deuterio para UV y Wolframio para visible, emite radiación que atraviesa la muestra. La cantidad de luz absorbida por cada analito es medida por un fotodetector, y la señal registrada del analito se transforma en un cromatograma en el que cada pico representa un compuesto, siendo la altura o el área del pico proporcional a la concentración del analito.

Para la comparación de detectores el equipo el cual dispone el laboratorio cuenta con un detector UV-Vis de la marca shimadzu, el cual se puede apreciar en la Figura 1-6.

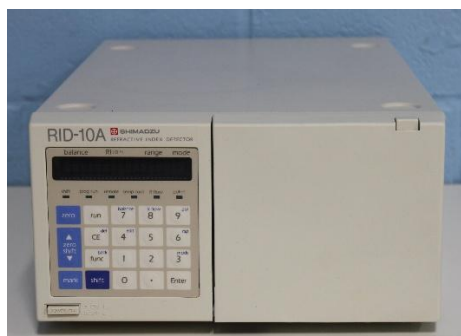
- d) Detector DAD: El detector DAD es un tipo avanzado de detector UV-Vis que permite registrar simultáneamente la absorción de la muestra en múltiples longitudes de onda. Su principio operativo consiste en que la luz emitida por una fuente de deuterio o xenón atraviesa la celda de flujo que contiene el efluente de la columna, y posteriormente se dispersa mediante un prisma o una red de difracción, separando la radiación en diferentes longitudes de onda. Un arreglo de diodos puede detectar simultáneamente la intensidad de luz absorbida en cada longitud de onda.



Fuente: Speck and burke.[23]

Figura 1-9. Detector DAD.

- e) Detector RID: El detector RID es un detector no específico que mide cambios en el índice de refracción del efluente de la columna respecto a un flujo constante de fase móvil pura. Es especialmente útil para detectar compuestos que no absorben UV-Vis, como ciertos azúcares, alcoholes y algunos ácidos orgánicos simples. Su principio operativo se basa en que el efluente de la columna pasa por una celda de flujo dividida en dos caminos: uno que contiene la fase móvil pura como referencia y otro que contiene la muestra con el analito. La diferencia de índice de refracción entre ambos caminos provoca un desvío de la luz que atraviesa la celda.



Fuente: American laboratory trading.[24]

Figura 1-10. Detector RID.

- f) Columna SHIM-PACK SCR-101 H: Esta columna es un tipo de columna de intercambio iónico diseñada específicamente para la separación de ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos polares. Su fase estacionaria está basada en resina de poliestireno sulfonada, lo que le otorga propiedades iónicas que permiten la separación de compuestos según su carga y acidez. El principio de separación de la columna se basa en el intercambio iónico, los aniones de los ácidos, como cítrico, láctico o acético, interactúan con los sitios cargados positivamente de la resina.



Fuente: Uvison.[25]

Figura 1-11. Columna SHIM-PACK SCR-101 H.

1.2.3. Materiales y reactivos

En el laboratorio se dispone de solventes de grado HPLC (agua ultrapura, metanol y ácido fosfórico o sulfúrico), materiales de filtración tales como los filtros de jeringa de 0,22 - 0,45 μm y reactivos de los ácidos orgánicos de interés en el estudio. Estos insumos cumplen los criterios de calidad analítica y están almacenados adecuadamente, protegidos de la luz y a temperatura controlada.^{[3][4][5]}

Para la correcta realización y validación del método propuesto se deberá realizar la compra de los estándares certificados de los ácidos orgánicos de interés, los cuales serían el ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético.

1.2.4. Recursos tecnológicos y de soporte

El laboratorio cuenta con sistemas informáticos y software compatibles con el HPLC, permitiendo adquisición, procesamiento y almacenamiento seguro de los datos cromatográficos adquiridos durante las corridas. Los registros físicos y digitales permiten tener un control de las muestras, estándares y condiciones de corrida, asegurando trazabilidad de todo el proceso del análisis.^{[9][12]}

1.2.5. Aspectos normativos y de seguridad

Dentro del laboratorio se cumplen las normas de seguridad química y eléctrica, incluyendo el uso de los EPP y tener los protocolos de disposición de residuos líquidos, de acuerdo con lineamientos de la OIV y la legislación vigente.^[4]

Se mantiene registro de calibración y mantenimiento de equipos y columnas, garantizando la reproducibilidad de los resultados y cumpliendo con la normativa que entrega la guía práctica sobre la validación métodos analíticos en Chile.^{[8][13][14]}

1.3. Contextualización de los ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son componentes esenciales en el vino, debido a que influyen directamente en su sabor, aroma, color y estabilidad. Estos compuestos determinan el equilibrio entre el dulzor y la acidez, contribuyendo las características sensoriales y químicas que definen la calidad del producto final. Entre los más importantes se encuentran el ácido tartárico, málico, cítrico, láctico, acético y succínico, cada uno con funciones específicas dentro del proceso de vinificación.

Durante la fermentación y maduración del vino, las concentraciones de estos ácidos pueden variar debido a transformaciones bioquímicas naturales de este mismo o al uso de distintos tratamientos enológicos. Por esta razón, su cuantificación resulta fundamental para controlar la calidad del vino, para poder garantizar su estabilidad y cumplir con las normativas vigentes del sector vitivinícola.

El estudio de los ácidos orgánicos mediante las técnicas instrumentales, el HPLC, nos permite obtener una información más precisa y confiable sobre su composición. En el contexto de este trabajo, la determinación teórica de estos compuestos busca no solo comprender su comportamiento en diferentes tipos de vino, sino también desarrollar y adaptar un protocolo analítico viable con los recursos disponibles en el laboratorio universitario, fortaleciendo así la capacidad de análisis y formación en métodos cromatográficos en los estudiantes.

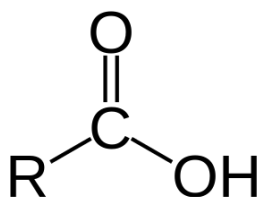
1.3.1. Grupos carboxílicos

El grupo carboxílico (-COOH) es la unidad funcional característica de los ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, acético y láctico presentes en el vino. Este grupo está formado por un átomo de carbono unido mediante un doble enlace a un oxígeno (C=O) y mediante un enlace sencillo a un grupo hidroxilo (-OH). Su estructura otorga a la molécula un comportamiento polar y ácido, debido a la posibilidad de donar un protón (H^+) desde el grupo hidroxilo, generando un anión carboxilato ($-COO^-$) y estabilizando la carga negativa por resonancia entre los dos átomos de oxígeno.^[26]

Los ácidos que contienen uno o más grupos carboxílicos tienden a ser solubles en agua debido a la formación de puentes de hidrógeno con el solvente.^[4] Considerando que su acidez depende tanto de la estructura del ácido como de la presencia de otros grupos funcionales adyacentes que puedan estabilizar o desestabilizar el anión formado tras la disociación.^{[26][27]}

En el contexto enológico, los grupos carboxílicos determinan en gran medida la acidez total y el pH del vino, influyendo en sus propiedades sensoriales, estabilidad química y microbiológica. Por ejemplo, el ácido láctico, con un solo grupo carboxílico y un grupo hidroxilo, es más suave al paladar; mientras que el ácido acético, al poseer un solo grupo carboxílico sin sustituyentes estabilizantes, se percibe con un carácter más volátil y picante.^{[1][2]}

Durante el análisis cromatográfico por HPLC, la presencia del grupo carboxílico permite la ionización parcial de los ácidos en función del pH de la fase móvil, lo que influye en su interacción con la fase estacionaria y, por ende, en su tiempo de retención. Por esta razón, el conocimiento del comportamiento químico de los grupos carboxílicos es esencial para poder optimizar las condiciones cromatográficas, como el pH del eluyente, el tipo de columna y el modo de detección.^[9]



Fuente: Ácido carboxílico.[28]

Figura 1-12. Grupo carboxilos.

1.3.2. Ácido Láctico

El ácido láctico se forma principalmente durante la fermentación maloláctica, cuando el ácido málico es convertido en ácido láctico por acción de bacterias lácticas, siendo un proceso que además genera dióxido de carbono. Este ácido monocarboxílico tiene un sabor más suave y redondo, lo que contribuye a la disminución de la acidez percibida y da una mejora en la armonía gustativa del vino.^{[1][5]}

Además de su impacto sensorial, el ácido láctico tiene un papel relevante en la estabilidad microbiológica del vino, debido a que su presencia limita el crecimiento de microorganismos indeseables tras la fermentación. En términos enológicos, el control de su concentración es esencial para definir el estilo final del vino, especialmente en tintos y blancos de crianza, donde la fermentación maloláctica busca potenciar notas lácteas, mantecosas o avainilladas que enriquecen el perfil aromático del producto final.

El análisis cuantitativo del ácido láctico permite evaluar la eficacia de la fermentación maloláctica y verificar la ausencia de fermentaciones indeseadas posteriores. Su presencia equilibrada refleja un proceso controlado y contribuye significativamente para tener un sabor redondo, complejidad aromática y estabilidad sensorial de los vinos.^{[1][3]}



Fuente: Aprender de vino.[29]

Figura 1-13. Formación del ácido láctico.

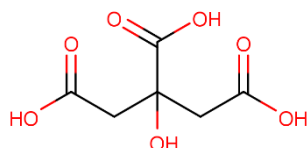
1.3.3. Ácido Cítrico

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico presente en las uvas en cantidades relativamente bajas en comparación con el tartárico y el málico. No obstante, este desempeña un papel

importante en la acidez total y el equilibrio gustativo del vino. Puede tener origen tanto natural, siendo procedente de la misma fruta, como microbiano, generado por ciertas levaduras y bacterias durante la fermentación.^{[1][3]}

A pesar de su menor concentración, el ácido cítrico contribuye a mantener la frescura y vitalidad del vino, aportando notas frutales y una sensación gustativa más brillante, especialmente se logra apreciar en vinos blancos y rosados. Asimismo, puede intervenir en el equilibrio redox del vino y en la estabilidad del color, lo que lo convierte en un componente relevante para la conservación y presentación del producto final.^[5]

Desde una perspectiva tecnológica, el ácido cítrico puede actuar como agente quelante, estabilizando metales como hierro y cobre que podrían catalizar reacciones oxidativas indeseadas. Sin embargo, su concentración debe mantenerse dentro de límites adecuados, ya que un exceso podría favorecer la actividad bacteriana y la formación de ácido acético generando así un sabor avinagrado.^{[3][5]}



Fuente: Chemical trading guide.[30]

Figura 1-14. Ácido cítrico.

1.3.4. Ácido Acético

El ácido acético es un ácido monocarboxílico volátil que se forma principalmente durante la fermentación alcohólica y el almacenamiento, producto de la actividad de bacterias acéticas que oxidan el etanol en presencia de oxígeno. Su concentración es un indicador crítico de calidad, ya que niveles elevados generan olores y sabores avinagrados, asociados al deterioro del vino o su conversión en vinagre.^{[1][2][3]}

Aunque pequeñas cantidades de ácido acético pueden contribuir a la complejidad aromática del vino, su exceso se percibe negativamente, afectando la calidad sensorial y comercial del producto. Por este motivo, el control de su formación mediante condiciones adecuadas de fermentación, almacenamiento hermético y manejo higiénico del vino es esencial.

La determinación precisa del ácido acético mediante técnicas cromatográficas, como la HPLC, es indispensable para evaluar el estado del vino y prevenir defectos. Este

parámetro se incluye habitualmente en los controles de calidad enológicos para garantizar que el vino cumpla con las especificaciones legales y sensoriales exigidas por la industria.^{[6][7]}



Fuente: Concepto, fórmula, propiedades y aplicaciones.[31]

Figura 1-15. Formación del ácido acético.

1.4. Materiales y reactivos

Para la implementación del método analítico por HPLC para la determinación de ácidos orgánicos en vino, se requieren los siguientes materiales y reactivos, los cuales el laboratorio dispone.

1.4.1. Materiales y equipos

- HPLC con detector UV-Vis, DAD o RID.
- Columna cromatográfica adecuada para ácidos orgánicos (columna de intercambio iónico).
- Viales con sus respectivas tapas.
- Frascos Scott de vidrio para el almacenamiento de muestras y soluciones.
- Micropipetas y puntas (rangos entre: 10 –1000 µL).
- Vortex.
- Centrifuga.
- Balanza analítica.
- Filtros de jeringa de 0,45 µm o 0,22 µm para clarificación de muestras.
- Matraces aforados para preparación de soluciones y estándares.
- Baño de termostato.
- Jeringas para filtrar.

1.4.2. Reactivos y soluciones

- Agua ultrapura o desionizada (HPLC grade).
- Estándares de ácidos orgánicos de alta pureza: ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético.
- Solventes HPLC-grade, según la fase móvil utilizada (ácido fosfórico diluido, ácido sulfúrico diluido o mezcla agua–metanol).

- Muestras de vino (tinto y blanco), previamente filtradas y preparadas según el protocolo.

Tabla 1-1. Recursos disponibles y requeridos para el análisis.

Recursos disponibles	Recursos requeridos
HPLC	HPLC
Detector	Detector
Columna cromatográfica	Columna cromatográfica
Column oven	Column oven
Bomba isocrática	Bomba isocrática
Desgasificador	Desgasificador
Software de datos	Software de datos
Agua HPLC	Agua HPLC
Ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico
Jeringas	Jeringas
Filtros 0,22 – 0,45 μm	Filtros 0,22 – 0,45 μm
Viales	Viales
Muestras de vino (tinto y blanco)	Muestras de vino (tinto y blanco)
Balanza analítica	Balanza analítica
pH-metro	pH-metro
Refrigerador	Refrigerador
EPP	EPP
Micropipeta	Micropipeta
Centrifuga	Centrifuga
Tubos falcón	Tubos falcón
Baño ultrasonido	Baño ultrasonido
Contenedores de residuos químicos	Contenedores de residuos químicos
Matraces	Matraces
Frascos ámbar	Frascos ámbar
-	Registro de curvas de calibración
-	SOP
-	Estándares de ácidos orgánicos

1.5. Parámetros críticos para el análisis

El análisis de los ácidos orgánicos mediante HPLC requiere controlar una serie de parámetros críticos que aseguran la separación eficiente y la cuantificación precisa de los compuestos presentes en el vino. Entre los más importantes se encuentran las

características de la columna cromatográfica, la fase móvil, el flujo, la temperatura, la longitud de onda para su detección y las condiciones en las cuales se preparará la muestra.

1.5.1. Columna cromatográfica

La columna se considera un parámetro crítico dentro de la cromatografía líquida de alta resolución, debido a que esta es el componente donde ocurre la separación real de los analitos, siendo el corazón del sistema. Su función principal es permitir que los compuestos presentes en la muestra interactúen con la fase estacionaria contenida en su interior, generando distintos grados de retención que determinan el tiempo de salida de cada compuesto analizado. En el caso de los ácidos orgánicos, estas interacciones se producen en función de la acidez, el tamaño molecular y la afinidad iónica de cada ácido, lo que define el orden y la calidad de la separación. Cualquier alteración en las características de la columna, tales como su composición, estado o tipo de fase puede modificar directamente los tiempos de retención y los perfiles cromatográficos obtenidos durante la corrida, afectando la precisión del análisis.

Además, la columna tiene una influencia determinante sobre la resolución y la selectividad del método, debido a que, si la columna pierde eficiencia por contaminación, sobrepresión o envejecimiento, los picos pueden solaparse, impidiendo la correcta cuantificación de los compuestos. Por esta razón, durante la validación de un método analítico, se define con exactitud el modelo y las condiciones de la columna, puesto que su sustitución por otra con diferentes características podría generar resultados no reproducibles.

Asimismo, la columna cromatográfica está asociada a una serie de condiciones operativas críticas que deben controlarse rigurosamente, como la temperatura, la presión del sistema, la compatibilidad química con la fase móvil y los procedimientos de acondicionamiento y limpieza. Una variación en cualquiera de estos factores puede alterar la eficiencia de separación o deteriorar la fase estacionaria. Esto impacta directamente la exactitud y precisión del método, debido a que una columna mal acondicionada o contaminada puede generar picos asimétricos, desplazamientos en los tiempos de retención y un aumento del ruido de base, comprometiendo la confiabilidad de los resultados. En el análisis de ácidos orgánicos en vino, donde las concentraciones suelen ser bajas y las diferencias entre compuestos estrechas, estas variaciones pueden inducir errores analíticos significativos. Por ello, la columna cromatográfica no solo representa un componente operativo, sino un elemento fundamental que determina la validez, reproducibilidad y confiabilidad del análisis cromatográfico.^{[1][2][9]}

1.5.2. Fase móvil

La fase móvil es un parámetro crítico, debido a que controla el modo en que los analitos se desplazan a través de la columna y determina la eficiencia, selectividad y reproducibilidad del proceso de separación. Su composición, pH, fuerza iónica, pureza y flujo influyen directamente en los tiempos de retención, la resolución de los picos y la sensibilidad del detector. Es decir que cualquier variación en la fase móvil puede modificar el equilibrio entre la fase estacionaria y los compuestos que se desean analizar, afectando la exactitud y precisión del método cromatográfico.

En el caso de los ácidos orgánicos, la fase móvil juega un papel determinante porque su naturaleza define las interacciones iónicas y polares que se producen dentro de la columna. Usualmente se utiliza un medio ácido, puesto que esto garantiza que los analitos se encuentren en su forma disociada y que la columna mantenga sus sitios activos correctamente protonados, permitiendo una separación eficiente basada en la diferencia de afinidad iónica entre los ácidos cítrico, láctico y acético. Si la concentración del ácido o su pH varían, las fuerzas de interacción cambian, generando desplazamientos en los tiempos de retención o pérdida de resolución entre los picos.

Otro aspecto que convierte a la fase móvil en un parámetro crítico es su pureza, las impurezas o partículas en el solvente pueden provocar ruido en la línea base elevado, formación de burbujas o incluso dañar la bomba y el detector. Por ello, la fase móvil debe prepararse con agua ultrapura, solventes de grado HPLC, además de ser desgasificada (mediante vacío o ultrasonido) para evitar fluctuaciones de presión y picos falsos en el cromatograma. Asimismo, el flujo de la fase móvil es controlado por la bomba isocrática, debido a que debe mantenerse constante, puesto que variaciones mínimas pueden alterar el tiempo de retención y la reproducibilidad del análisis.

En síntesis, la fase móvil es un parámetro crítico porque define las condiciones químicas del sistema cromatográfico, afectando directamente la selectividad, la estabilidad del método y la calidad del resultado analítico. En análisis de vinos, una fase móvil correctamente optimizada y controlada permite obtener una separación reproducible y confiable de los principales ácidos orgánicos, garantizando resultados representativos del perfil ácido del producto final.^{[1][2][9]}

1.5.3. Flujo

El flujo de la fase móvil constituye un parámetro crítico en cromatografía porque regula directamente la velocidad con que los analitos se desplazan a través de la columna, afectando el equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil, y determinando así la resolución, el tiempo de retención y la reproducibilidad del método. Si el flujo es demasiado alto, los analitos no alcanzan un equilibrio adecuado con la fase estacionaria, lo que provoca picos más anchos y con una menor resolución; mientras que, si el flujo es

demasiado bajo, los tiempos de retención aumentan y la difusión longitudinal de los picos se hace más significativa, reduciendo la eficiencia analítica.

El flujo también tiene un impacto directo sobre la presión del sistema cromatográfico, debido a que un aumento en el caudal eleva la contrapresión dentro de la columna, pudiendo superar los límites de operación y dañar tanto la fase estacionaria como los sellos del equipo, por el contrario, un flujo inestable o pulsante genera fluctuaciones en la línea base, desplazamientos en los tiempos de retención y variaciones en la respuesta del detector, afectando la exactitud del análisis. Por ello, los sistemas de bombeo isocráticos deben mantener un flujo constante y libre de pulsaciones, garantizando la estabilidad del sistema y la reproducibilidad del método.

En el análisis de ácidos orgánicos en vinos, mantener un flujo óptimo y estable es esencial para lograr una separación eficiente y reproducible de compuestos como el ácido cítrico, láctico y acético. Este parámetro debe ser cuidadosamente validado durante los estudios de robustez del método, evaluando su influencia sobre los tiempos de retención, la resolución y la respuesta de los picos. Un método robusto debe tolerar pequeñas variaciones en el flujo sin comprometer la confiabilidad analítica, condición indispensable para asegurar la calidad de los resultados.^{[1][2][32]}

1.5.4. Temperatura de la columna

La temperatura de la columna es un parámetro crítico porque influye directamente en la viscosidad de la fase móvil, la cinética de partición de los analitos y la estabilidad de la fase estacionaria. La temperatura permite mantener condiciones de separación constantes, reduciendo la variabilidad en los tiempos de retención y mejorando la reproducibilidad del método. Cuando la temperatura aumenta, la viscosidad del disolvente disminuye, lo que facilita un flujo más estable y reduce la presión del sistema; sin embargo, también se modifican los coeficientes de partición y las interacciones entre el analito y la fase estacionaria, afectando la selectividad y la resolución cromatográfica.^[3]

En columnas utilizadas para la separación de ácidos orgánicos en matrices como el vino, mantener una temperatura controlada bajo los 60 °C es esencial para garantizar la estabilidad del equilibrio iónico y la reproducibilidad de los tiempos de retención. Puesto que pequeñas variaciones térmicas pueden causar cambios en la ionización de los analitos, especialmente en compuestos débiles como los ácidos cítrico, láctico y acético, modificando sus tiempos de elución y en la forma de los picos. Por lo cual, la temperatura actúa como un factor clave para asegurar una buena separación.^{[1][2][33]}

Además, la temperatura puede afectar la vida útil de la columna y la integridad química de la fase estacionaria, debido a que temperaturas excesivas pueden acelerar la degradación del empaquetamiento o causar desprendimiento de grupos funcionales en la

fase estacionaria, mientras que temperaturas demasiado bajas pueden aumentar la viscosidad del solvente, generar picos asimétricos y aumentar la presión del sistema. Por esta razón, los hornos de columna con control térmico preciso son indispensables en el desarrollo y validación de métodos cromatográficos robustos, especialmente cuando se busca cuantificar analitos.

En definitiva, en el análisis de ácidos orgánicos en vino es importante mantener una temperatura constante permite minimizar las fluctuaciones en la línea base y asegurar la estabilidad del sistema en el detector. Este parámetro debe incluirse en los estudios de robustez, evaluando cómo pequeñas variaciones (± 2 °C) afectan la resolución, el tiempo de retención y la respuesta de los analitos. Un método validado debe demostrar que el desempeño analítico se mantiene dentro de límites aceptables ante dichas variaciones térmicas, garantizando la fiabilidad del resultado final.^{[1][3][33]}

1.5.5. Longitud de onda para la detección

La longitud de onda de detección es un parámetro crítico en HPLC porque determina la sensibilidad y selectividad del método analítico. En los detectores espectrofotométricos, como el UV-Vis o el DAD, cada compuesto presenta una absorbancia característica en función de su estructura molecular y de los grupos cromóforos que contiene cada analito. Por lo cual seleccionar una longitud de onda adecuada permite maximizar la respuesta del analito y minimizar la interferencia de otros componentes de la matriz, garantizando así una cuantificación precisa y reproducible.^[9]

Una elección incorrecta de la longitud de onda puede generar una señal débil, pérdida de linealidad o interferencias provenientes de otros compuestos que absorben en la misma región espectral. Por ello, antes de fijar este parámetro, se recomienda realizar un análisis espectral previo de los analitos de interés para identificar el máximo de absorbancia (λ_{max}). En el caso de los ácidos orgánicos presentes en el vino, como el láctico, acético y cítrico, su absorción directa en el rango UV es baja; por esta razón, suele emplearse detección indirecta o derivatización previa para aumentar la respuesta, seleccionando longitudes de onda específicas entre 210 y 220 nm donde la fase móvil presenta una mínima interferencia.^{[1][2]}

Además, la longitud de onda afecta la relación señal/ruido y con relación a eso afecta a LOD y LOQ. Una longitud de onda demasiado baja puede aumentar el ruido debido a la absorción del disolvente o de impurezas, mientras que una longitud de onda muy alta puede reducir la respuesta del analito. Por lo cual, este parámetro debe incluirse en los estudios de robustez y validación del método, verificando que pequeñas variaciones en la longitud de onda (± 2 nm) no afecten significativamente la exactitud ni la precisión de los resultados.^[9]

En relación con el análisis de ácidos orgánicos en vino por HPLC, la correcta selección y control de la longitud de onda garantiza la sensibilidad necesaria para detectar concentraciones bajas en matrices complejas y asegurar la fiabilidad del método cromatográfico.^{[1][2]}

1.5.6. Volumen de inyección

El volumen de inyección es un parámetro crítico en HPLC, debido a que esto determina la cantidad de analito que se introduce en el sistema, afectando directamente la sensibilidad, la linealidad y la resolución de los picos cromatográficos. Un volumen de inyección demasiado grande puede sobrecargar la columna, causando picos anchos, asimétricos o solapados, lo que disminuye la resolución entre analitos cercanos y compromete la exactitud y precisión de la cuantificación. A diferencia de tener un volumen demasiado pequeño puede generar señales débiles, dificultando la detección y aumentando LOD y LOQ.^[9]

En métodos para la determinación de ácidos orgánicos en vino, la selección del volumen de inyección debe considerar la capacidad de carga de la columna y la sensibilidad del detector utilizado. En este caso la columna de intercambio iónico como la SHIM-PACK SCR-101 H tienen un volumen máximo recomendado que asegura que los analitos mantengan un comportamiento lineal sin afectar la forma de los picos ni la resolución entre ácidos cítrico, láctico y acético. Ajustar correctamente el volumen de inyección permite obtener cromatogramas reproducibles, unos picos bien definidos y áreas proporcionales a la concentración real del analito.^{[1][2][34]}

Concluyendo que el volumen de inyección es crítico, debido a que impacta directamente con la sensibilidad, resolución y reproducibilidad del método HPLC. Su correcta optimización y control son fundamentales para garantizar la exactitud y confiabilidad de la cuantificación de ácidos orgánicos en matrices complejas como el vino.^{[1][2][9]}

1.5.7. Filtración y preparación de las muestras

La filtración y preparación de las muestras constituyen un criterio crítico en HPLC, debido a que esto asegura que los analitos lleguen a la columna en condiciones adecuadas, libres de partículas, coloides o materiales que puedan obstruir el sistema o interferir en la detección. La presencia de partículas sólidas puede generar sobrepresión en la columna, daño a los empaquetamientos y bombas, o provocar picos irregulares, ruido en la línea base y pérdidas de resolución. Por ello, la filtración de las muestras a través de membranas de 0,22–0,45 μm es una práctica para garantizar la integridad del sistema cromatográfico y la reproducibilidad de los resultados.^{[1][9]}

La preparación de la muestra es fundamental para asegurar la compatibilidad con la fase móvil y evitar interferencias químicas. En el análisis de ácidos orgánicos en matrices complejas como el vino, es común realizar pasos como dilución, ajuste de pH o centrifugación previa, con el objetivo de que los analitos estén en la forma adecuada para la separación, evitando cambios de solubilidad o degradación. Estas acciones previenen reacciones secundarias y aseguran que la concentración de los compuestos a analizar se mantenga dentro del rango lineal del método.^{[1][2]}

En relación con lo antes dicho, la filtración y preparación de la muestra son esenciales para garantizar la confiabilidad del método HPLC, protegiendo la columna y los detectores, evitando interferencias y asegurando resultados reproducibles y precisos en la determinación de ácidos orgánicos en vinos.^{[1][2][9]}

1.6. Evaluación de columna disponible

Previo a la implementación del método cromatográfico propuesto, se realizó una evaluación de la columna disponible en el laboratorio con el fin de determinar su idoneidad para la separación de los ácidos orgánicos presentes en las muestras de vino. Siendo esta etapa fundamental para asegurar que las características del material de empaque, las dimensiones y el tipo de fase estacionaria sean compatibles con los analitos y las condiciones operativas del sistema HPLC.^{[1][2]}

La columna SHIM-PACK SCR-101H fue seleccionada debido a que está especialmente diseñada para la separación de ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos polares. Su fase estacionaria consiste en una resina de poliestireno sulfonada con propiedades de intercambio iónico, que permite separar los analitos en función de su carga y grado de disociación. Presenta dimensiones de 300 mm de longitud y 7,9 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 10 μm , lo que proporciona una adecuada resolución cromatográfica y una presión operativa estable.^[34]

Asimismo, esta columna es compatible con fases móviles acuosas acidificadas, utilizadas frecuentemente en la determinación de ácidos orgánicos por HPLC. Además, de tener un desempeño óptimo con detectores RID y DAD los cuales son apropiados para este tipo de compuestos no volátiles y con baja absorbancia en el espectro UV.^[33]

En función de estas características, se concluye que la columna seleccionada disponible en el laboratorio cumple con los requerimientos técnicos necesarios para la separación y cuantificación de los ácidos láctico, acético y cítrico presentes en muestras de vino mediante HPLC.

CAPÍTULO 2: DISEÑO DEL PROTOCOLO ANALÍTICO

2.1. Procedimiento operativo estándar (SOP)

El Procedimiento operativo estándar (SOP) es un documento que describe de manera detallada el paso a paso cada una de las etapas de un método analítico. Su aplicación tiene un rol clave en garantizar la reproducibilidad y la trazabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

2.1.1. Reproducibilidad

La reproducibilidad es la capacidad de obtener resultados confiables y comparables al repetir un mismo análisis bajo condiciones similares, independientemente del analista o del momento en que se realice el análisis. El SOP está directamente relacionado a la reproducibilidad, debido a los siguientes pasos.

- a) Estandarizar los procedimientos, indicando de forma precisa las cantidades, tiempos, condiciones instrumentales y materiales que se deben utilizar.
- b) Reducir la variabilidad operativa, al asegurar que todos los analistas sigan las mismas etapas y criterios.
- c) Garantizar la coherencia metodológica entre diferentes corridas, lo que permite comparar resultados en distintos momentos, asegurando así que la metodología tiene alta reproducibilidad.

De esta manera, el SOP transforma una técnica experimental en un proceso controlado y repetible, donde los resultados dependen de los analitos y no de la interpretación individual.

2.1.2. Trazabilidad

La trazabilidad, se refiere a la capacidad de rastrear el recorrido de un proceso a través de todas sus etapas, tales como el origen, el desarrollo y el resultado de cada análisis, garantizando que todos los pasos puedan ser verificados y documentados. El SOP respalda esta trazabilidad mediante simples pasos.

- a) Llevar un registro sistemático de los procedimientos, equipos, reactivos y condiciones experimentales empleadas.
- b) Tener una identificación clara de las responsabilidades en cada etapa del proceso analítico.

- c) Control documental, al incluir versiones fechadas, revisadas y aprobadas, lo que asegura la integridad y validez del método aplicado.
- d) Cumplimiento normativo, debido a que permite demostrar ante auditorías o evaluaciones externas que el laboratorio opera bajo estándares reconocidos como ISO 17025 o Buenas Prácticas de Laboratorio.

Por lo cual, cualquier resultado analítico puede ser vinculado a su origen, verificando con exactitud qué procedimientos, equipos y condiciones se aplicaron. Otorgando credibilidad, transparencia y confiabilidad a los datos generados.

2.2. Paso a paso del protocolo

El paso a paso del protocolo compone la guía detallada que permite ejecutar un método analítico de manera ordenada, segura y consistente. Teniendo como objetivo principal explicar de manera clara cada etapa del procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la obtención y registro de los resultados obtenidos, garantizando que cualquier analista pueda realizar el análisis bajo las mismas condiciones.

Teniendo este enfoque sistemático no solo se asegura la precisión y confiabilidad de los resultados, sino que también facilita la trazabilidad del análisis, al documentar cada acción realizada, los materiales utilizados y las condiciones instrumentales aplicadas. Además, permite identificar y minimizar posibles errores operativos, optimizando el desempeño cumpliendo con los estándares de calidad requeridos.

Para la determinación de ácidos orgánicos en vino por HPLC, el paso a paso detalla la preparación de las muestras, la selección de la fase móvil, la inyección en el sistema cromatográfico y la interpretación de los resultados, asegurando un análisis reproducible y controlado.

2.2.1. Selección de fase móvil

La selección de la fase móvil correcta para el análisis controla las interacciones entre los analitos y la fase estacionaria, determinando así su tiempo de retención. Si la composición no es adecuada, los picos cromatográficos pueden solaparse o presentar asimetrías, lo que dificultara la correcta identificación y cuantificación de los analitos estudiados. A diferencia de una fase móvil con una buena composición garantiza una resolución adecuada y una separación reproducible de los analitos.^[9] Por lo cual se deben considerar los siguientes factores.

- a) Separación de los analitos: La elección de la fase móvil influye en como los compuestos interactúan con la fase estacionaria, debido a que su composición define el equilibrio que existe entre la retención y la liberación de los analitos.
- b) Sensibilidad y reproducibilidad del método: Una mala composición química puede alterar la ionización de los compuestos y, por ende, su respuesta será menor. Por ello se debe tener cuidado en cambios mínimos en la concentración del ácido, debido a que esto genera variaciones en los tiempos de retención.
- c) Compatibilidad con el detector: El detector RID requiere fases móviles que no sean altamente absorbentes ni volátiles e isocrática, siendo la más frecuente el ácido sulfúrico diluido (0,005 – 0,01N), debido a que esta mantiene a los ácidos orgánicos en su forma disociada, lo que permite una buena conducción iónica
- d) Control en el pH y en la estabilidad química: El pH en la fase móvil es fundamental, sobre todo cuando se analizan ácidos orgánicos, debido a que son compuestos ionizables, con un pH incompatible se provocan cambios en el estado de ionización, afectando la retención de los analitos e incluso daño en la columna.
- e) Tiempo y eficiencia del método: Una buena elección en la fase móvil permite alcanzar un equilibrio entre la resolución y el tiempo de corrida, debido a que una fase móvil demasiado débil provoca tiempos de retención largos y una muy fuerte puede provocar que los analitos eluyan sin una separación adecuada.

2.2.2. Selección de detector y longitud de onda óptima

La selección de detector en un sistema de HPLC depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas de los analitos y los objetivos del método. Para la determinación de ácidos orgánicos en vinos, el detector RID es el más adecuado, debido a la baja absorción en el rango UV-Vis que presentan la mayoría de estos compuestos.^[2]

Este detector mide los cambios en el índice de refracción del eluyente cuando pasa un analito a través de la celda, permitiendo así detectar los compuestos que carecen de cromóforos o que presentan una baja absorción UV, como los ácidos de interés.^[35]

Este detector presenta algunas limitaciones, tales como una sensibilidad a los cambios de temperatura, presión y composición de la fase móvil, por lo que necesita condiciones isocráticas y estables durante toda la corrida cromatográfica.^[9] Por lo cual en su uso se utilizan fases móviles acuosas, como ácido sulfúrico diluido, que genera un contexto químicamente estable y uniforme.^[1]

La región de 210 nm permite detectar -COOH presentes los ácidos orgánicos del vino, debido a que presenta una débil pero suficiente absorción en el rango del ultravioleta.^[2]

La selección de la longitud de onda óptima se realiza evaluando la máxima absorbancia de los ácidos orgánicos mediante sus espectros UV. En el caso de los ácidos orgánicos, el rango de 210 ± 2 nm se ha considerado adecuado para lograr una respuesta analítica aceptable sin interferencias significativas del solvente utilizado.^[13]

La elección del detector y la longitud de onda debe tener un equilibrio entre la sensibilidad, la selectividad y la estabilidad del método. Para la determinación simultánea de ácidos orgánicos en matrices vínicas, el uso del detector RID en condiciones isocráticas con ácido sulfúrico diluido como fase móvil se ha consolidado como una de las composiciones más confiables y reproducibles, garantizando así una cuantificación precisa y trazable de los analitos de interés.^{[1][9]}

2.2.3. Inyección en el sistema cromatográfico

La etapa de inyección es un paso crítico dentro del proceso cromatográfico, debido a que marca el punto de entrada de la muestra al sistema y puede afectar directamente la precisión, reproducibilidad y resolución del análisis.^[35] Una inyección controlada garantiza que el volumen y la composición de la muestra sean consistentes entre corridas, permitiendo obtener resultados comparables y trazables.

La precisión del volumen de inyección dentro del sistema es fundamental, especialmente en métodos cuantitativos, donde cualquier variación puede producir errores significativos en la respuesta del detector y en consecuencia la concentración calculada de los analitos inyectados. Además, un exceso de volumen inyectado puede originar ensanchamiento de picos, pérdida de resolución o sobrecarga de la columna, afectando la calidad cromatográfica del sistema.^[13]

Antes de la inyección, la muestra debe encontrarse filtrada y libre de partículas, para así evitar obstrucciones en el sistema o daños en la fase estacionaria. El uso de filtros de jeringa de $0,22 - 0,45 \mu\text{m}$ es una práctica recomendada para garantizar la integridad del sistema.^[1]

La correcta realización en la etapa de inyección, junto con la calibración del equipo y la preparación adecuada de estándares y muestras, contribuye significativamente a la robustez y confiabilidad del método cromatográfico realizado, asegurando que los resultados obtenidos sean representativos y reproducibles.^{[13][35]}

2.2.4. Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados cromatográficos es la etapa final del análisis, en la cual se evalúan los datos obtenidos para determinar la presencia, la concentración y el

comportamiento de los analitos de interés. En el caso de los ácidos orgánicos presentes en vino, el análisis de los cromatogramas permite identificar y cuantificar compuestos como el ácido láctico, cítrico, acético, entre otros, los cuales poseen un papel esencial en la acidez total, estabilidad y perfil sensorial del vino.^[2]

La identificación de los analitos se realiza comparando los tiempos de retención de las muestras con los de los estándares certificados, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. Esta confirma la identidad de cada compuesto dentro de la matriz enológica.^[35] La cuantificación, en tanto, se obtiene a partir de las áreas de los picos registrados por el detector, las cuales son proporcionales a la concentración del analito en la muestra analizada.

Los datos cromatográficos son tratados mediante curvas de calibración previamente establecidas, que relacionan el área del pico con la concentración de los estándares. De esta forma, se garantiza una cuantificación precisa, siempre que la respuesta del detector se mantenga lineal en el rango de concentraciones estudiado.^[9]

Durante la interpretación de los datos, es importante considerar posibles factores de interferencia, tales como coalición, ruido en la línea base o presencia de impurezas, que pueden afectar la forma y simetría de los picos. Una buena resolución y una línea base estable indican un sistema correctamente optimizado y una fase móvil adecuadamente seleccionada.^[35]

La interpretación también incluye la evaluación de la reproducibilidad entre réplicas de los picos, tanto en tiempos de retención como en áreas de pico. Verificando que el coeficiente de variación (CV) sea menor al 2 % para poder considerar indicativos de buena repetibilidad del método.^[9]

Por lo cual una interpretación adecuada de los resultados cromatográficos obtenidos no solo permite verificar la calidad analítica del método, sino también obtener información enológica relevante sobre la composición ácido-base del vino, su estabilidad química y su perfil sensorial final.^{[1][2]}

2.3. Preparación de estándares y matrices

La preparación de estándares y matrices es una etapa esencial dentro del desarrollo de un método cromatográfico, debido a que garantiza la exactitud, linealidad y trazabilidad de los resultados obtenidos.^[35] En el análisis de ácidos orgánicos en vino, esta etapa permite establecer la relación entre la señal del detector y la concentración real de los analitos, asegurando una cuantificación confiable y reproducible.

2.3.1. Preparación de los estándares

Los estándares de cada ácido orgánico deben prepararse a partir de materiales de referencia certificados (≥ 99 % de pureza), pesados con precisión analítica. Las soluciones se preparan generalmente en agua ultrapura o en la misma fase móvil utilizada en el análisis, con el fin de mantener la compatibilidad química y evitar efectos de matriz.^[9]

Posteriormente, se deben preparar soluciones de trabajo por dilución sucesiva, cubriendo el rango de concentraciones esperado en las muestras de vino. Cada punto de la curva de calibración se inyecta por duplicado o triplicado para verificar la linealidad del detector.^[35] Este procedimiento permitirá determinar los parámetros de calibración, asegurando una respuesta proporcional entre la concentración del analito y el área del pico obtenidos.

Las soluciones estándar deben conservarse en recipientes ámbar y refrigeradas a 4 °C para evitar así su degradación o fermentación, especialmente en el caso de ácidos inestables como el cítrico.^[1] Además, se recomienda preparar nuevas soluciones periódicamente para garantizar la estabilidad y exactitud del método.

2.3.2. Preparación de la matriz de vino

Las muestras de vino deben someterse a un tratamiento previo antes de su inyección en el HPLC. El protocolo establece una dilución controlada del vino en agua ultrapura o fase móvil con una proporción 1:10, con el objetivo de adecuar las concentraciones de los ácidos orgánicos al rango lineal del detector RID y minimizar posibles efectos de saturación.^[2]

Posteriormente, las muestras se filtran mediante membranas de 0,22 - 0,45 μm , con el fin de eliminar partículas en suspensión, levaduras o coloides que puedan afectar la presión del sistema o dañar la columna.^[35] Este paso resulta necesario para proteger la fase estacionaria y asegurar una línea base estable en el cromatograma.

En caso de que el vino presente alta turbidez o contenido coloidal, puede aplicarse un tratamiento adicional mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, seguido de filtración, para obtener un extracto limpio y homogéneo antes del análisis, para ser inyectado.^[9]

Es recomendado inyectar tanto los estándares bajo las mismas condiciones cromatográficas, para así comparara entre los tiempos de retención y la consistencia de las respuestas obtenidas del detector.^[13]

2.4. Parámetros cromatográficos propuestos

La definición de los parámetros cromatográficos es fundamental para asegurar la reproducibilidad, sensibilidad y resolución del método analítico. En la determinación de ácidos orgánicos en vino mediante HPLC, estos parámetros deben seleccionarse en función del tipo de columna, la naturaleza de los analitos y el detector utilizado.[35]

2.4.1. Columna

El sistema propuesto emplea el uso de una columna SHIM-PACK SCR-101H, de fase estacionaria basada en resina de poliestireno sulfonada, diseñada para la separación de ácidos orgánicos, azúcares y compuestos polares. Esta columna opera bajo un mecanismo de intercambio iónico, permitiendo la separación en función del grado de disociación y tamaño molecular de los analitos.^[34] Su alta estabilidad química frente a medios ácidos y su compatibilidad con detectores de índice de refracción la convierten en una opción idónea para este tipo de análisis.^[13]

2.4.2. Fase móvil

La fase móvil seleccionada del método propuesto corresponde a una solución de ácido sulfúrico diluido (0,005 – 0,01 N), utilizada en modo isocrático. Esta composición permite mantener los ácidos orgánicos en su forma ionizada, favoreciendo su separación en la columna y garantizando una buena conductividad iónica, reduciendo la adsorción no específica y mejorando la simetría de los picos obtenidos.^{[1][2]}

2.4.3. Flujo

El flujo propuesto maneja un rango de 0,6 mL/min \pm 2 mL/min, optimizado para lograr un buen equilibrio entre la resolución y el tiempo total de análisis, debido a que un flujo estable es esencial para garantizar la reproducibilidad de los tiempos de retención y evitar variaciones en las respuestas obtenidas del detector.^[35]

2.4.4. Temperatura de columna

La temperatura de la columna en el método se establece que será de 30°C, puesto que la temperatura debe mantenerse constante durante toda la corrida, generalmente bajo los 60°C, debido a que pequeñas variaciones pueden afectar la viscosidad de la fase móvil, el equilibrio de partición y, por consecuencia, los tiempos de retención. Un control térmico adecuado contribuye a una línea base estable y picos bien definidos.^[9]

2.4.5. Detector y condiciones de lectura

El detector de índice de refracción (RID) se selecciona por su capacidad para medir compuestos que carecen de cromóforos, como los ácidos orgánicos. Este detector requiere condiciones de alta estabilidad térmica y composicional, por lo que se recomienda operar bajo condiciones isocráticas y evitar gradientes de solvente.^[13]

La temperatura de la celda del detector debe mantenerse entre 30 y 35 °C para minimizar el ruido de base y garantizar una señal constante.^[1]

2.4.6. Volumen de inyección

El volumen de inyección propuesto varía entre 10 y 20 μL , dependiendo de la sensibilidad requerida y la capacidad de la columna. Inyecciones mayores pueden generar ensanchamiento de picos o sobrecarga, mientras que los volúmenes demasiado bajos reducen la relación señal/ruido del cromatograma.^[35]

2.4.7. Tiempo total de corrida

El tiempo de análisis estimado para la separación completa de los principales ácidos orgánicos oscila entre 20 a 30 minutos, dependiendo de la longitud de la columna y del flujo aplicado. Este tiempo permite una separación clara entre los picos de ácido láctico, cítrico y acético, garantizando una resolución adecuada ($R_s > 1,5$).^[9]

En conjunto, estos parámetros cromatográficos propuestos proporcionan un método robusto, reproducible y compatible con la determinación de ácidos orgánicos en matrices enológicas, cumpliendo con los criterios de validación analítica y las buenas prácticas de laboratorio.^{[1][2]}

2.5. Elaboración del SOP

La elaboración del SOP para el método propuesto es considerado un proceso crítico para asegurar la correcta implementación, estandarización y validación de la metodología. Su construcción se basa en compilar, organizar y describir de una manera clara y detallada todas las etapas involucradas en el análisis, permitiendo así que cualquier persona pueda ejecutar el procedimiento de forma uniforme y reproducible.

Para este SOP se dividió en cuatro etapas principales, las cuales constan de la preparación de las muestras, las condiciones óptimas del equipo, la elección del detector, junto a su longitud de onda óptima y para finalizar se realizan los cálculos comprobando la concentración de los ácidos de interés analizados.

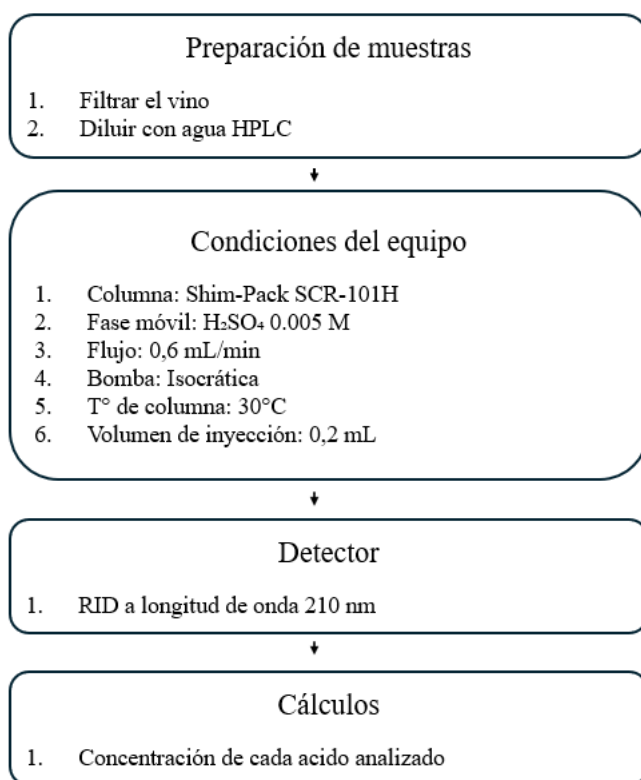


Figura 2-1. SOP

2.6. Comparación con otros protocolos (OIV y HPLC CON DAD)

Para la determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC la cual es una técnica utilizada y ampliamente documentada en la literatura enológica, debido a que es una técnica que es eficiente en evaluar los parámetros de calidad, fermentación y estabilidad del producto final. Sin embargo, las condiciones experimentales pueden variar entre autores, dependiendo del tipo de columna, la fase móvil, el tipo de detector y el tratamiento previo que se les realiza a las muestras.

Por lo cual, resulta relevante realizar una comparación entre protocolos permitiendo evaluar la coherencia metodológica, identificar las ventajas y limitaciones del procedimiento propuesto, mediante la comparación de la forma de adaptación a las condiciones instrumentales y de infraestructura del laboratorio.

En esta ocasión se compara el método propuesto con dos métodos, los cuales son mediante HPLC con detector DAD y un método oficial de la OIV.

2.6.1. Comparación de fase móvil

El protocolo propuesto utiliza como fase móvil una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,005 – 0,01 N bajo condiciones isocráticas, debido a que esta elección favorece la separación eficiente de los principales ácidos orgánicos del vino, manteniendo una buena resolución sin necesidad de un sistema gradiente o tampones más complejos.

El método HPLC con detector DAD utiliza una gradiente de agua acidificada con metanol o acetonitrilo, debido a que esta fase móvil permite analizar ácidos y polifenoles simultáneamente, pero requiere un mayor control en la gradiente, lo cual lleva a un mayor costo en solventes.^[36]

El método OIV indica que una fase móvil acuosa acidificada ofrece una alta reproducibilidad y estabilidad, algunas de ellas son ácido sulfúrico.^[37]

2.6.2. Comparación de columna cromatográfica

El método propuesto utiliza una columna SHIM-PACK SCR-101H, compuesta por resina de poliestireno sulfonada en forma H⁺, la cual está diseñada para separar compuestos polares y ácidos de bajo peso molecular.

El método HPLC con detector DAD emplea una columna Atlantis dC18 de fase reversa que retiene los analitos por interacciones hidrofóbicas. Permite separar simultáneamente ácidos orgánicos, compuestos furánicos y polifenoles en una sola corrida.^[36]

El método oficial de la OIV permite el uso de columnas C8/C18 o resinas de intercambio iónico, teniendo un enfoque estandarizado el cual garantiza reproducibilidad entre laboratorios, siendo adecuado para los principales ácidos del vino, aunque no prioriza la velocidad ni la separación de compuestos fenólicos, proponiendo esta columna HPX-87 H BIO-RAD.^[37]

2.6.3. Comparación de detector y longitud de onda

En el protocolo desarrollado se utiliza un detector RID en un rango de 210 nm, el cual resulta ideal para la cuantificación de ácidos orgánicos que no presentan grupos cromóforos absorbentes en el rango UV-Vis. Este tipo de detector ha sido ampliamente recomendado para el análisis de ácidos en matrices vínicas.^[2]

Por otro lado, en el método que utiliza detector DAD a 210 nm, lo cual permite obtener espectros completos, debido a que aumenta la selectividad y es más sensible que un detector UV.^[36]

El método oficial de la OIV presenta el uso del detector UV a 210 nm, teniendo una sensibilidad intermedia, pero ofreciendo resultados reproducibles y estandarizados.^[37]

2.6.4. Comparación en condiciones de flujo y temperatura

El protocolo propuesto establece un flujo isocrático de 0.6 mL/min y una temperatura en la columna de 30 °C, condiciones que garantizan una adecuada resolución sin comprometer la integridad del material de empaque de la columna utilizada, debido a que una temperatura moderada reduce la degradación térmica de la resina y permite tener un equilibrio más estable en el tiempo de retención, incrementando levemente el tiempo de la corrida, la elección propuesta demuestra una adaptación adecuada del método a las condiciones del laboratorio, priorizando la estabilidad del sistema sobre la velocidad analítica.

El método que utiliza el detector DAD utiliza un flujo de 1,0 mL/min y una temperatura de 30°C, lo cual permite que todos los componentes pasen por la columna de una forma más rápida.^[36]

La OIV propone el mismo flujo de 0,6 mL/min para los ácidos de interés, a diferencia de la temperatura, la cual es entre 60 a 65°C dependiendo de la resina que tenga la columna utilizada para el análisis.^[37]

2.6.5. Comparación en preparación de muestras y estándares

En el protocolo propuesto, las muestras de vino se filtran con membranas de 0,22 – 0,45 μm y se diluyen en proporción 1:10 con agua ultrapura antes de la inyección. No se aplica derivatización ni se realiza un ajuste de pH previo, lo que simplifica el procedimiento y evita pérdidas de compuestos volátiles en las muestras.

En el método con detector DAD se realiza una inyección directa tras solamente un proceso de filtración del vino, simplificando así la preparación de las muestras y permitiendo un análisis de alto rendimiento.^[36]

La OIV propone que se requiere una dilución, filtración y desgasificación obligatoria, siguiendo el protocolo de estandarizado.^[37]

2.6.6. Comparación en el tipo de elución

El método propuesto utiliza una elución isocrática, al igual que el método oficial de la OIV, lo que asegura alta reproducibilidad entre corridas y facilita la comparación de

resultados en diferentes días de análisis, puesto que el tipo de columna empleada usa exclusivamente la elución isocrática, debido a que la separación depende de las interacciones iónicas entre los ácidos y la matriz de la resina.^[37]

A diferencia del método que utiliza el detector DAD que su tipo de elución es en gradiente y esto se debe a que el método combina la separación de ácidos con la separación de polifenoles y compuestos más hidrofóbicos, por lo cual se exige un aumento progresivo en la proporción de la fase móvil orgánica.^[36]

Dado que el objetivo del análisis es la determinación de ácidos orgánicos del vino, la elución isocrática resulta suficiente, reduciendo tanto el tiempo de equilibrado del sistema como el consumo de solventes, además de considerar los materiales y equipos disponibles en el laboratorio.

CAPÍTULO 3: PLAN DE VALIDACIÓN TEÓRICA

3.1. Concepto de linealidad, precisión, exactitud, LOD, LOQ y robustez

Para la validación de un método analítico, se debe demostrar que el procedimiento utilizado sea adecuado, confiable y reproducible. En el caso del análisis de ácidos orgánicos en vino mediante HPLC, los parámetros de validación fundamentales incluyen la linealidad, precisión, exactitud, LOD y LOQ, así como la robustez.

Cada uno de estos criterios permite evaluar distintos aspectos del desempeño del método utilizado, garantizando que los resultados obtenidos en el análisis sean representativos y comparables entre diferentes corridas o analistas.

Para evaluar el rendimiento del método HPLC se establecieron KPI cuantitativos asociados a la calidad analítica. Estos indicadores permiten monitorear la reproducibilidad del método propuesto, la confiabilidad de las mediciones y la eficiencia del análisis.[8]

3.1.1. Linealidad

La linealidad se define como la capacidad del método para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en el rango de trabajo establecido previamente.

Para evaluar la linealidad, se preparan soluciones estándar de cada ácido en al menos cinco niveles de concentración distintas, y se registra el área de los picos correspondientes. Posteriormente, se construye una curva de calibración y se determina el coeficiente de correlación (R^2), que debe mostrar una relación lineal, generalmente superior a 0,995 para asegurar que las mediciones sean consistentes y aceptables.

3.1.2. Precisión

La precisión representa el grado de concordancia entre resultados obtenidos en las mediciones repetidas bajo las mismas condiciones experimentales, reflejando así la homogeneidad y la reproducibilidad del método. En cromatografía líquida, se utiliza generalmente mediante múltiples inyecciones de una misma muestra o estándar, calculando la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (%CV) de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos. Los valores de SD o %CV inferiores al 2% suelen

considerarse indicativos de una buena repetibilidad del método, lo que indica que este presenta una excelente precisión.

Existen dos niveles de precisión, los cuales son la repetibilidad, que corresponde a las mediciones realizadas por el mismo analista, con el mismo equipo y en condiciones controladas; y la reproducibilidad, que evalúa la precisión bajo condiciones variables, los cuales son en diferentes días, analistas o instrumentos. En el presente proyecto, la evaluación de la precisión se centrará en la repetibilidad, para lo cual se efectuarán al menos seis mediciones independientes del mismo analito de interés en una muestra de referencia, verificando que los valores de SD y %CV se mantengan dentro de los rangos estadísticos o normativos aceptables.^[8]

Para el cálculo de la precisión se evalúa calculando que tan dispersos están los resultados obtenidos entre sí, de mediciones repetidas de una misma muestra bajo las mismas condiciones, para esto se utilizan las fórmulas de la SD y el %CV.

Para el cálculo de la SD se requiere la siguiente formula:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

- x_i : Cada valor obtenido de la medición
- \bar{x} : Promedio de los valores obtenidos
- n : Número de las mediciones

Para el cálculo del %CV se requiere la siguiente formula:

$$\%CV = \left(\frac{SD}{\bar{x}}\right) \times 100$$

Donde:

SD : Desviación estándar calculada anteriormente

\bar{x} : Promedio de los valores obtenidos

100: Para expresar el resultado en porcentaje

3.1.3. Exactitud

La exactitud indica qué tan cercano está el resultado obtenido por el método respecto al valor real o verdadero del analito en la muestra. Esta se evalúa comparando los resultados con un estándar de referencia o mediante estudios de recuperación en muestras fortificadas, donde se espera que los valores obtenidos se encuentren entre un 95% y 105%

para asegurar la correcta cuantificación del analito. La exactitud puede expresarse también como sesgo o t-endos, reflejando la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero. Obtener una buena exactitud se confirma que no existen interferencias significativas de la matriz vónica ni pérdidas del analito durante la preparación de la muestra o durante el análisis, garantizando así la confiabilidad del método propuesto.^[8]

Para el cálculo del sesgo se requiere la siguiente formula:

$$\text{Sesgo} = \bar{x} - \text{valor de referencia}$$

Para obtener el sesgo en porcentaje se requiere de la siguiente formula:

$$\% \text{Sesgo} = \frac{\bar{x} - \text{valor de referencia}}{\text{valor de referencia}} \times 100$$

Donde:

\bar{x} : Promedio de los valores obtenidos

valor de referencia: valor verdadero del analito

100: Para expresar el resultado en porcentaje

Para el cálculo del sesgo con t-Student, se deben realizar al menos 6 mediciones del analito de interés en una muestra de referencia, donde se debe calcular la media de los datos y la SD, para determinar el valor del sesgo y los límites de tolerancia mediante intervalos de confianza.

Para el cálculo del t-Student se requiere la siguiente formula:

$$\text{Sesgo} \pm t_{(1-\alpha, v)} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Sesgo: Valor obtenido mediante calculo anterior

$t_{(1-\alpha, v)}$: Valor critico de la distribución, para un nivel de confianza determinado

$1 - \alpha$: Nivel de confianza

v : Grados de libertad ($v = n - 1$)

s : Desviación estándar

n : Número total de mediciones realizadas

3.1.4. LOD y LOQ

El LOD es la concentración mínima del analito que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada con precisión y el LOQ, es la menor cantidad del analito que puede ser cuantificada con una precisión aceptable.

En el análisis de ácidos orgánicos, estos límites indican la sensibilidad del método, permitiendo asegurar la detección confiable de compuestos presentes en bajas concentraciones, como el ácido acético en vinos de baja acidez.

Para tener un LOD aceptable se establece que debe cumplirse la condición LC (límites críticos) $< LOD < LMP$ (límite máximo permitido), Por lo cual el valor obtenido debe ser menor a una fracción del LMP, si el LMP $> 0,1$ ppm, entonces el LOD $< 1/10$ del LPM, así asegurando que el método puede detectar concentraciones relevantes.^[8]

Para el cálculo del LOD se requiere la siguiente fórmula:

$$LOD = 3,29 \times S_o$$

Donde:

- S_o : desviación estándar del blanco matriz
- Factor 3,29: corresponde a un nivel de confianza del 99% del análisis

Para un LOQ con una precisión aceptable, típicamente donde la SD es del 10% a 6%, se realiza el cálculo con una fórmula propuesta, la cual permite que la medición sea confiable para fines cuantitativos.

Para el cálculo de LOQ se requiere de la siguiente fórmula:

$$LOQ = 10 \times S_o$$

Donde:

- S_o : desviación estándar del blanco matriz
- El LOQ se define generalmente como 10 veces la desviación estándar del blanco, asegurando así una cuantificación confiable y con precisión aceptable.

Los parámetros de LOD y LOQ son indicadores clave de la sensibilidad de un método cromatográfico, los cuales se realizan utilizando la SD del blanco matriz y ciertos factores multiplicadores, considerando los niveles de confianza y las condiciones específicas del método analítico.^[8]

3.1.5. Robustez

La robustez es la capacidad del método de mantenerse válido ante pequeñas variaciones en los parámetros del procedimiento, lo cual indica la fiabilidad del método en condiciones normales de uso, confirmando así que cambios menores nos afectan significativamente en los resultados obtenidos.

En el protocolo propuesto, la robustez se verifica realizando ligeras variaciones en la temperatura (± 2 °C) o en el flujo de fase móvil (± 0.1 mL/min), observando la estabilidad de la respuesta del detector RID. Si los resultados se mantienen dentro de los límites de variabilidad aceptables, se confirma que el método es confiable y resistente a condiciones rutinarias de laboratorio.

3.1.6. Indicadores claves de desempeño (KPI)

Los KPI son indicadores para asegurar el rendimiento y la confiabilidad del método desarrollado, estos se incorporaron en el procedimiento, debido a que estos indicadores permiten evaluar de forma cuantitativa la calidad analítica del procedimiento realizado, al monitorear los parámetros fundamentales tales como la linealidad, la precisión, la exactitud, la sensibilidad instrumental, el porcentaje de recuperación y la capacidad de separación cromatográfica de los analitos. La inclusión de estos KPI facilita el control continuo del método, permitiendo verificar su robustez operativa a lo largo del proceso analítico, asegurando así que los resultados obtenidos cumplan con los estándares exigidos y las buenas prácticas de laboratorio. A continuación, se presentan los KPI definidos para el método y su respectiva evaluación frente a los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 3-1. KPI del análisis.

KPI	Ácidos evaluados	Criterio de aceptación	Valor esperado	Cumplimiento
Linealidad	Crítico, Láctico y Acético	$\geq 0,999$	0,9990 – 0,9995	Cumple
Precisión intra-día	Crítico, Láctico y Acético	$\leq 2\%$	1,2 – 1,8%	Cumple
Precisión inter-día	Crítico, Láctico y Acético	$\leq 3\%$	1,5 – 2,5%	Cumple
Exactitud % de recuperación	Crítico, Láctico y Acético	95 a 105%	97 a 102%	Cumple
LOD	Crítico, Láctico y Acético	$\geq 0,05$ g/L	0,05 – 0,08 g/L	Cumple

LOQ	Crítico, Láctico y Acético	$\geq 0,15$ g/L	0,15 – 0,20 g/L	Cumple
Resolución	Crítico, Láctico y Acético	$\geq 1,5$	2,0 – 2,5	Cumple
Tiempo de retención	Crítico, Láctico y Acético	$\pm 0,1$ min	$\pm 0,05$ min	Cumple

3.2. Preparación de curvas de calibración

La curva de calibración es una herramienta fundamental en la validación y cuantificación mediante HPLC, debido a que permite establecer la relación entre la concentración del analito y la respuesta obtenida del detector. A través de ella se verifica la linealidad del método y se determina el rango de concentraciones en el cual la señal analítica es proporcional a la cantidad de compuesto presente en la muestra analizada.

3.2.1. Principio de la calibración

El principio de la calibración se basa en que, dentro de un rango determinado, el área del pico cromatográfico registrado por el detector es directamente proporcional a la concentración del analito inyectado. El objetivo de la curva de calibración es obtener una ecuación de regresión lineal de la forma:

$$y = mx + b$$

- y = Área del pico
- x = Concentración del analito
- m = Pendiente
- b = Intercepto con el eje y

3.2.2. Preparación de los estándares

Para la determinación de ácidos orgánicos en vino, se preparan soluciones patrón individuales de cada ácido, utilizando agua ultrapura como solvente. A partir de estas soluciones madres, se elaboran soluciones de trabajo a diferentes concentraciones dentro del rango esperado en muestras de vino, las cuales son entre 50 y 1000 mg/L según el compuesto.

Cada nivel de concentración debe analizarse en duplicado o triplicado, registrando el área de los picos obtenidos. Estos valores se emplean para graficar la curva de calibración, permitiendo evaluar la respuesta del detector RID ante cambios en la concentración.

3.2.3. Rangos de trabajo

El rango de concentraciones seleccionado debe abarcar los niveles esperados en las muestras de vino, garantizando que las respuestas se encuentren dentro del rango lineal obtenidas del detector. Se recomienda emplear al menos cinco puntos de calibración, distribuidos de manera uniforme a lo largo del rango de trabajo, las cuales irán en un rango de 10 – 600, 20 – 800 y 50 - 1000 mg/L.

Cada punto de la calibración debe ser inyectado en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras, para mantener la comparabilidad de las señales obtenidas.

Tabla 3-2. Rangos de trabajo

Ácido orgánico	Rango de concentración (mg/L)	Concentraciones de los estándares (mg/L)
Ácido cítrico	50 – 1000	50, 100, 250, 500, 750 y 1000
Ácido acético	20 – 800	20, 50, 100, 200, 400, 600 y 800
Ácido láctico	10 – 600	10, 25, 50, 100, 250, 400 y 600

3.2.4. Evaluación de la linealidad

Con los datos obtenidos, se realiza el ajuste lineal y se calcula el coeficiente de determinación (R^2). En métodos cromatográficos validados, se considera aceptable un $R^2 \geq 0.995$, lo cual indica una excelente correlación entre concentración y respuesta obtenida.

En el contexto del análisis de ácidos orgánicos en vino, una curva de calibración bien definida permite obtener resultados confiables en la cuantificación de los principales compuestos analizados responsables de la acidez total del vino, reflejando la robustez del método frente a variaciones instrumentales o de matriz.

3.2.5. Aplicación de la curva de calibración

Una vez validada la linealidad de los datos obtenidos, la ecuación de la curva se utiliza para calcular las concentraciones de los ácidos orgánicos presentes en las muestras de vino. La concentración se obtiene sustituyendo el área del pico de la muestra en la ecuación de regresión.

3.3. Procedimiento para pruebas de robustez

La robustez se define como la capacidad de un método analítico para mantener su desempeño y confiabilidad frente a pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros experimentales. Esta evaluación permite determinar la estabilidad operativa del sistema y la sensibilidad del método ante cambios rutinarios que pueden ocurrir durante su aplicación en laboratorio.^[8]

Para la determinación de ácidos orgánicos en vino mediante HPLC, las pruebas de robustez se orientan a identificar los factores críticos que puedan afectar la retención, resolución y área de los picos cromatográficos. El procedimiento recomendado incluye las siguientes etapas.

3.3.1. Parámetros a evaluar

Se seleccionan variables en parámetros a evaluar consideradas críticas dentro del método, cuyas ligeras modificaciones podrían influir en los resultados. Entre las variables más relevantes se incluyen:

- Temperatura de la columna: ± 2 °C respecto a la condición óptima propuesta.
- Flujo de fase móvil: ± 0.1 mL/min respecto al valor nominal propuesta.
- Concentración de fase móvil: ± 0.002 N respecto a la concentración propuesta.
- Volumen de inyección: variación de ± 2 μ L respecto al volumen propuesto.
- Longitud de onda del detector: ± 2 nm respecto al valor óptimo propuesto.

3.3.2. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental del método se desarrolló siguiendo las condiciones específicas para la separación de los ácidos orgánicos en vino de interés, utilizando una columna de resina sulfonada Shim-Pack SCR-101H y un detector RID. Cada etapa fue

diseñada para garantizar la correcta preparación de los estándares, la estabilidad del sistema cromatográfico y la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

En primer lugar, se prepararon las soluciones patrón individuales de los ácidos orgánicos seleccionados a partir de estándares de alta pureza. Se empleó material volumétrico calibrado para asegurar la trazabilidad de las concentraciones. A partir de estas soluciones madre, se prepararon soluciones de trabajo en el rango requerido para la construcción de la curva de calibración, procurando conservarlas en refrigeración y protegidas de la luz para evitar la degradación de las curvas.

La fase móvil consistió en agua ultrapura acidificada con ácido sulfúrico al 0,005 – 0,01 N, preparada el mismo día del análisis. Esta solución fue filtrada a través de membranas de 0,22 - 0,45 μm y desgasificada por ultrasonido para asegurar la estabilidad de la línea base del detector RID, debido a que este es altamente sensible a cambios de temperatura, presión y composición del solvente.

Antes del análisis, la columna Shim-Pack SCR-101H fue acondicionada con fase móvil durante un periodo mínimo de 30 minutos hasta observar una presión estable y una línea base sin fluctuaciones. El equipo HPLC se llevó a una temperatura constante de 30°C, condición necesaria para minimizar el ruido del detector. El flujo se fijó en 0,6 mL/min, siguiendo las recomendaciones para esta columna de intercambio iónico entregadas por el fabricante.

Las muestras de vino fueron sometidas a una preparación mínima, la cual consistente en centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm para eliminar partículas en suspensión, seguida de filtración por membrana de 0,22 - 0,45 μm y finalmente, se realizó una dilución 1:10 en agua ultrapura para adecuar las concentraciones al rango analítico del método y evitar sobrecargar la columna o saturar el detector con partículas del vino.

Una vez preparadas las muestras y estándares, se procedió a la inyección de 20 μL en modo de elución isocrática, utilizando la misma fase móvil durante toda la corrida cromatográfica, permitiendo la separación adecuada de los ácidos orgánicos en función de su movilidad a través de la resina sulfonada.

Durante cada corrida se monitorean los parámetros críticos tales como la presión del sistema, la forma de los picos, el tiempo de retención y la estabilidad de la línea base. Las cuales sirven para garantizar la precisión del método, cada muestra fue analizada al menos por duplicado, y los estándares se inyectaron al inicio, mitad y final de la secuencia para verificar la estabilidad de la calibración.

Finalmente, los cromatogramas obtenidos se procesaron mediante el software de adquisición, aplicando una integración coherente entre los picos. A partir de las áreas se construyeron las ecuaciones de calibración y se calcularon las concentraciones de los ácidos en las muestras de vino. Todos los resultados fueron posteriormente evaluados

mediante los parámetros de validación establecidos, los cuales son la linealidad, la repetibilidad, la precisión, la exactitud, los LOD y LOQ, y la robustez del método.

3.4. Definición de rangos de concentración y criterios de aceptación

La definición del rango de concentración y los criterios de aceptación son elementos fundamentales en la validación de un método analítico, debido a que establece los límites dentro de los cuales el método produce resultados confiables y precisos.^[8]

3.4.1. Rangos de concentración

Para el rango de concentración especifica las cantidades o niveles de analito en los cuales el método ha sido evaluado y validado. Este rango debe cubrir desde la concentración más baja que puede ser detectada y cuantificada con certeza, hasta niveles cercanos a la concentración máxima permitida o requerida.

En el presente método, desarrollado para la determinación simultánea de los principales ácidos orgánicos del vino, el rango de concentración se definió considerando tanto los niveles típicos presentes en vinos comerciales como la respuesta lineal del detector RID.

Los rangos analíticos establecidos entregados en la tabla 3-2 permiten cubrir adecuadamente la variabilidad esperada en vinos, asegurando que las concentraciones presentes en las muestras se encuentren dentro del intervalo de respuesta lineal del sistema cromatográfico.

3.4.2. Criterios de aceptación

Los criterios de aceptación son los parámetros que definen los límites cuantitativos o estadísticos que los resultados deben cumplir para demostrar que el método es fiable en esos rangos específicos, los cuales deben cumplir para que sea considerado válido dentro del proceso de validación.^[8]

Además, para que el método propuesto se considere robusto las variaciones aplicadas no deben generar diferencias significativas en los parámetros analíticos seleccionados, según los siguientes criterios:

- Linealidad: Se espera un R^2 , superior a 0.995 para asegurar que las mediciones sean consistentes y aceptables.
- LOD: Se debe cumplirse la condición $LC < LOD < LMP$.
- LOQ: Una precisión aceptable, es donde la SD es del 10% a 6%.

- Precisión: Teniendo un SD inferior al 2% son considerados indicativos de buena repetibilidad.
- Exactitud y Porcentaje de recuperación: El resultado obtenido debe situarse entre un 95% a 105%, para asegurar que el método da resultados correctos.
- Sesgo: Cercano a 0% indica una excelente exactitud, también es aceptable para HPLC un 5%.
- Especificidad y selectividad: La interferencia de matrices o componentes debe estar controlada, y las interferencias conocidas deben ser corregidas.
- Cambios en el tiempo de retención (<2%) respecto al valor nominal.
- Variación del área del pico obtenido de las muestras (<5%).
- Resolución entre picos adyacentes ($R_s > 1.5$) en todas las condiciones.
- Sin aparición de picos adicionales o solapamiento significativo entre analitos.

Por lo que, si alguna de estas variables mencionadas genera desviaciones mayores en el cromatograma, se considera un factor crítico y debe ser controlado estrictamente durante el análisis rutinario del método.

3.5. Recursos requeridos y costos asociados

Para la determinación de ácidos orgánicos en vino mediante HPLC, se requiere una infraestructura analítica adecuada, así como recursos materiales, humanos y financieros que garanticen la correcta ejecución del método analítico. A continuación, se detallan los principales elementos necesarios y los costos asociados estimados, considerando su desarrollo en un laboratorio universitario.

3.5.1. Recursos instrumentales y materiales

El equipamiento instrumental constituye la parte central del análisis, debido a que de su calidad y mantenimiento depende la reproducibilidad y exactitud de los resultados obtenidos.

Tabla 3-3. Recursos instrumentales y materiales.

Recursos instrumentales/materiales	Funcionamiento	Marca	Costo asociado (CLP)
------------------------------------	----------------	-------	----------------------

HPLC con detector RID	Separación y cuantificación de los ácidos orgánicos mediante detector RID.	Shimadzu	11.160.80
Columna	Fase estacionaria basada en resina sulfonada, específica para ácidos orgánicos.	Shimadzu	2.200.000
Viales	Contienen de forma segura las soluciones de muestra y estándar.	Soviquim	104.500
Filtros de jeringa 0,22 – 0,45 μm	Eliminan sólidos, residuos y micropartículas de las muestras o de los estándares.	Labfil	46.100
Jeringas	Succionar la muestra y forzarla a través del filtro	Cranberry	10.000
Ultrasonido	Facilitar la disolución de los estándares y la homogeneización de las muestras.	Soviquim	228.400
Vortex	Homogeneizar completamente las muestras antes de filtrarlas.	Neuaction	195.000
Balanza analítica	Pesaje exacto de estándares y reactivos.	Sigma-aldrich	1.370.000
Centrifuga	Clarificar muestras turbias o con sedimentos antes de la filtración.	Sigma-aldrich	283.000
pH-Metro	Control del pH durante la preparación de muestras.	Hanna instruments	761.150
Micropipetas	Transferencia precisa de volúmenes de reactivos y estándares.	Proimeq	22.500
Refrigerador	Conservación de estándares y muestras.	Daewoo	189.990
Software	Control del HPLC y procesamiento de curvas de calibración.	Labsolution	1.000.000

Dando un total estimado de \$17.550.640 CLP, el cual incluye todos los recursos instrumentales y materiales necesarios para realizar el análisis.

3.5.2. Reactivos, solventes y estándares

Los materiales utilizados en la determinación de ácidos orgánicos influyen directamente en la calidad analítica del método analítico y en el costo operativo por muestra analizada.

Tabla 3-4. Reactivos, solventes y estándares.

Reactivos/estándares	Uso	Marca	Costo asociado (CLP)
Ácido sulfúrico	Fase móvil para la elución de los ácidos.	Science lab limited	9.000
Estándar ácido cítrico	Preparación de curvas de calibración.	Merck	93.500
Estándar ácido acético	Preparación de curvas de calibración.	Merck	104.000
Estándar ácido láctico	Preparación de curvas de calibración.	Merck	98.400
Agua ultrapura	Preparación de fases móviles y disoluciones.	Soviquim	7.600 el Litro

Dando un total estimado de \$312.500 CLP, el cual incluye todos los reactivos y estándares utilizados durante el análisis.

3.5.3. Recursos humanos y tiempos de corridas

Para el desarrollo y ejecución del método analítico dentro del ámbito universitario se requiere personal calificado en cromatografía y análisis instrumental, además de alumnos que puedan llevar a cabo la realización de las tareas, debido que una asignación correcta de las responsabilidades permite asegurar la trazabilidad del método y así tener la correcta implementación.

Tabla 3-5. Recursos Humanos y tiempos

Encargado	Actividad	Tiempo estimado
Alumnos	Preparación de estándares y curvas de calibración	1 – 2 horas
Alumnos	Preparación de muestras	30 minutos

Alumnos	Corrida cromatográfica	2 – 3 horas
Alumnos	Procesamiento de datos y cálculo de parámetros en estudio	1 hora
Profesor encargado	Revisión de resultados y orientación durante el desarrollo	1 hora
Ayudante de laboratorio	Preparación de fase móvil, desgasificación y control del inventario	1 – 2 horas
Ayudante de laboratorio	Control del uso de las EPP, manejo de residuos peligrosos y la verificación de cumplimiento de protocolos internos	30 minutos

Esto nos da un total de entre 6 a 10 horas por corrida, las cuales se dividen en varias secciones, las cuales pueden irse realizando de manera simultánea para acortar los tiempos.

3.5.4. Costos indirectos y de mantenimiento

Además de los costos directos asociados al método y a todos los recursos necesarios, se deben considerar los gastos indirectos asociados al funcionamiento del laboratorio.

Tabla 3-6. Costos indirectos

Gastos indirectos/mantenimiento	Costo asociado (CLP)
Mantenimiento HPLC	1.800.000
Cambio de columna	2.200.000
Electricidad	132.000
Agua ultrapura	7.600 el Litro
Gestión de residuos químicos	87.980

Dando un total estimado de \$4.227.580 CLP, el cual incluye todos los gastos indirectos y de mantenimientos los cuales son necesarios para mantener la estabilidad del equipo cromatográfico y garantizar la calidad continua de los análisis realizados.

3.5.5. Costo total y costo total real del análisis

El costo total de la implementación del análisis propuesto presenta dos escenarios según el alcance considerado. En primer lugar, considerando todos los recursos necesarios para ejecutar completamente el método asumiendo empezar desde cero, el costo asciende a \$22.090.720 CLP, lo que implica un costo aproximado por muestra de \$14.000 CLP. Sin embargo, si se considera únicamente el costo de los estándares necesarios para la ejecución del método propuesto, el costo total real para la implementación del método se reduce a aproximadamente \$4.320.000 CLP, lo que equivale a un valor de \$4.320 CLP por muestra. Este análisis permite diferenciar entre el costo global del método y el costo operativo, considerando solamente los estándares de los ácidos orgánicos de interés, el cambio de columna y la mantención respectiva del equipo cromatográfico.

3.6. Tiempo de validación

La validación del método analítico forma una etapa fundamental para garantizar que la metodología desarrollada para la determinación de los ácidos orgánicos sea confiable, reproducible y adecuada para su propósito. A través de este proceso se evalúan parámetros esenciales, tales como la selectividad, linealidad, exactitud, precisión, LOD y LOQ, robustez y estabilidad, las cuales permiten demostrar que el método propuesto cumple con los criterios establecidos por las guías y los requerimientos propios del laboratorio.

La correcta planificación y ejecución de la validación no solo respalda la calidad de los resultados analíticos obtenidos, sino que también asegura que la técnica pueda ser aplicada de manera consistente en rutinas futuras, minimizando errores y fortaleciendo la trazabilidad del método. A continuación, se presenta el desglose detallado de los ensayos realizados y los criterios considerados para cada parámetro evaluado.

3.6.1. Preparación del protocolo

Esta etapa tiene como objetivo dejar por escrito el alcance del estudio, los criterios de evaluación y el plan experimental que guiará la validación del método. Para ello se desarrollan diversas tareas, comenzando con la redacción del protocolo, donde se define el alcance, la matriz de estudio, la lista de analitos de interés, el rango cuantitativo y los requisitos de calidad que se deberán cumplir con la metodología. Para ello, se establecen los parámetros a evaluar durante la validación del método, incluyendo especificidad, linealidad, exactitud, precisión, LOD y LOQ, robustez, estabilidad. Junto con ello, se determinan los criterios de aceptación para cada parámetro propuesto, de acuerdo con las guías analíticas aplicables.

El protocolo también incorpora un listado completo de materiales y reactivos necesarios para el desarrollo del análisis, tales como los estándares, solventes, viales y soluciones madre; además del equipamiento requerido, como el sistema HPLC, la columna cromatográfica. Incluyendo los formatos de registro que se utilizarán para documentar los resultados obtenidos y las hojas de cálculo. Una vez finalizado el análisis, el protocolo debe ser revisado, firmado y aprobado por los responsables designados, garantizando así la trazabilidad del proceso. El tiempo estimado para completar esta fase de planificación y documentación es de aproximadamente 1 a 2 días.

3.6.2. Preparación de los estándares

Para esta etapa se lleva a cabo la preparación de los estándares y los controles respectivos, junto con la verificación del material utilizado en la validación del método. Esto incluye la preparación de las soluciones madre y las diluciones correspondientes para los analitos de interés. A partir de estas soluciones se preparan los estándares para las curvas de calibración necesarios para el estudio de linealidad. Paralelamente también se preparan matrices blanco de vino, las cuales son empleadas como blanco matriz durante la evaluación del método. Es recomendable preparar cantidades suficientes de todas las soluciones para cubrir la totalidad de las réplicas previstas a realizar. El tiempo estimado para completar esta etapa es de aproximadamente 1 día.

3.6.3. Verificación del equipo HPLC

La verificación del equipo se realiza para confirmar que el instrumental funciona correctamente antes de iniciar las corridas formales de la validación del método. Para ello se realiza la inyección repetida de un estándar, evaluando los parámetros clave como el tiempo de retención, la repetibilidad del área expresada como SD %, el número de platos teóricos, el factor de asimetría y la resolución entre los picos considerados críticos para el método. Todos los cromatogramas obtenidos deben registrarse y revisarse para determinar si se cumple con los criterios de aceptación establecidos. El tiempo estimado para completar esta verificación es de aproximadamente 1 día.

3.6.4. Selectividad de los analitos

Para la evaluación de la selectividad de los analitos se deberá demostrar que cada analito se separa y cuantifica adecuadamente sin interferencias provenientes de la matriz o de

otros compuestos existentes. Para ello se realizan inyecciones de la fase móvil, del blanco matriz, de los estándares individuales y de la mezcla completa de analitos. Considerando además la posible confusión por matriz, evaluando la presencia de picos que puedan coeluir en los mismos tiempos de retención. También se examina la existencia de posibles impurezas o productos de degradación, por lo que todos los cromatogramas generados deben registrarse para cada una de las condiciones evaluadas. Se espera la ausencia de señales interferentes en torno al tiempo de retención de cada analito y la evidencia de una separación clara. El tiempo estimado para completar esta etapa es de aproximadamente 1 a 2 días.

3.6.5. Rangos de concentración y linealidad

Para la evaluación de los rangos de concentración y de la linealidad se debe demostrar que existe una relación proporcional y consistente entre la respuesta obtenida y la concentración de los analitos dentro del intervalo de trabajo definido. Para lo cual se diseñan entre cinco y siete niveles de rangos de concentración según el rango requerido por el método. Cada nivel se inyecta por triplicado en un mismo día para asegurar la igualdad en las condiciones analíticas. Con los datos obtenidos se calcula la regresión correspondiente, ya sea lineal simple o ponderada, además se evalúan el R^2 , como criterios de aceptación se suelen exigir valores superiores de un $R^2 \geq 0.995$. El tiempo estimado para completar esta etapa considerando la preparación de estándares, las corridas cromatográficas y el análisis estadístico es de aproximadamente 2 días.

3.6.6. Porcentaje de recuperación

La evaluación de la exactitud, expresada como el porcentaje de recuperación, se basa en comprobar la capacidad del método para cuantificar correctamente los analitos presentes en la matriz analizada. Para ello se realizan fortificaciones de las muestras de vino en tres niveles de concentración: un nivel bajo cercano al LOQ, un nivel medio aproximadamente en la mitad de los rangos de trabajo y un nivel alto equivalente al 80 o 100% del valor máximo de los rangos. En cada nivel se preparan entre 3 y 5 muestras, como mínimo 3 para cumplir con los requisitos básicos y hasta 5 para incrementar la robustez del método. Cada muestra se prepara por triplicado y posteriormente se analiza, calculándose el porcentaje de recuperación como la relación entre la concentración observada y la concentración añadida multiplicada por 100. Los criterios de aceptación habituales consideran una recuperación promedio entre 95% a 105%. El tiempo estimado para completar esta etapa es de aproximadamente 2 días.

3.6.7. Análisis de precisión

La evaluación de la precisión del método se divide en dos fases complementarias, las cuales constan de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la fase de repetibilidad se realizan 6 inyecciones de una misma muestra en un mismo día y por el mismo analista, calculando el porcentaje de SD tanto del área como de la concentración obtenida, donde se suele exigir una $SD \leq 2-5\%$. Posteriormente, la precisión intermedia se evalúa la variabilidad entre días, analistas, donde el análisis se repite en al menos tres días distintos y por analistas diferentes, procesando entre 3 y 6 muestras por día. Los resultados se analizan mediante ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre las fuentes de variación. Teniendo como criterio general, se espera que la SD total no supere el 10%, considerando los rangos analíticos. El tiempo estimado para completar estas evaluaciones es de aproximadamente 1 día para la repetibilidad y entre 3 a 4 días para el estudio de la repetibilidad realizando las mediciones en diferentes días.

3.6.8. Confirmación de LOD y LOQ

Para la determinación del LOD y el LOQ se debe realizar mediante la relación señal/ruido, para esto se preparan diluciones sucesivas hasta identificar el nivel en el que se obtiene una señal/ruido cercano a 3 para el LOD y una señal/ruido aproximado de 10 para el LOQ. Una vez determinado el LOQ, este debe confirmarse analizando 6 muestras y verificando así que tanto la precisión como el porcentaje de recuperación sean adecuadas para el método. El tiempo estimado para completar esta etapa es de aproximadamente de 1 día.

3.6.9. Plan de robustez

Para la evaluación del plan de robustez se determina el efecto de pequeñas variaciones en las condiciones experimentales y verificar si el método se mantiene ante los cambios realizados. Entre las variables típicas a modificar se incluyen el flujo, la temperatura de la columna, la composición de la fase móvil y el volumen de inyección. Para estas modificaciones se diseña una matriz de experimentos, debido a que mediante estos cambios uno a la vez se busca evaluar las interacciones. En cada condición modificada se inyectan los estándares, evaluando posibles cambios en los tiempos de retención, el área de los picos, la resolución entre los compuestos y el porcentaje de recuperación obtenido.

El tiempo estimado para completar esta evaluación es de aproximadamente 1 a 2 días.

3.6.10. Estabilidad de los estándares y las muestras

La evaluación de la estabilidad de los estándares y las muestras determina si los analitos analizados permanecen sin cambios significativos durante la preparación y el almacenamiento, para lo cual se recomiendan distintos ensayos, los cuales constan de la estabilidad a temperatura ambiente durante 0, 2, 6 y 24 horas, la estabilidad refrigerada a 4 °C durante 0, 24, 48 y 72 horas, la estabilidad a largo plazo, almacenando las muestras varias semanas a -20 °C, evaluación así los ciclos de congelación y descongelación. Las muestras control se preparan y analizan en los tiempos indicados, comparando los resultados con el tiempo inicial. El tiempo estimado para completar esta evaluación varía entre 1 a 3 días, considerando que algunas pruebas requieren esperar entre 48 a 72 horas para obtener los resultados de estabilidad.

3.6.11. Análisis de datos

Para la etapa del análisis de datos, la cual consiste en procesar y evaluar toda la información obtenida durante la validación del método. Entre las tareas se incluyen el cálculo de regresiones, desviaciones y SD, así como la realización de análisis de varianza para evaluar la precisión intermedia. Además, se generan gráficas de apoyo, como curvas de calibración y cromatogramas representativos de los datos obtenidos. El análisis busca verificar el cumplimiento de los criterios establecidos, documentando cualquier desviación detectada y las acciones correctivas implementadas. El tiempo estimado para completar esta fase varía entre 1 a 2 días.

3.6.12. Repetición y acciones correctivas

La etapa de repeticiones y acciones correctivas se aplica cuando algún parámetro evaluado durante la validación no cumple con los criterios establecidos. En estos casos, se debe identificar la causa del problema, que puede estar relacionada con el equipo, la preparación de muestras o la matriz, y repetir el ensayo nuevamente. Todas las acciones correctivas deben registrarse de manera detallada, incluyendo los ajustes realizados, y además se deben repetir las verificaciones para asegurar que el equipo funciona correctamente antes de retomar las pruebas. El tiempo estimado para esta fase es variable y depende de la causa del problema, generalmente entre 1 a 2 días.

3.6.13. Tiempo total de validación

El tiempo total estimado para la validación del método propuesto para la determinación de ácidos orgánicos se proyecta en aproximadamente 24 días hábiles, considerando la ejecución de todas las actividades planificadas, desde la preparación del protocolo y estándares, hasta la realización de ensayos de linealidad, exactitud, precisión, robustez y estabilidad, finalizando con el análisis de datos. Esta planificación asegura que cada parámetro del método se evalúe de una manera completa y que los resultados obtenidos sean confiables y reproducibles para su aplicación rutinaria.

DISCUSIÓN

El estudio teórico realizado para la determinación de ácidos orgánicos presentes en vino mediante HPLC con detector RID permite comprender la relevancia analítica de este método para el control de calidad enológico. Según la literatura, los principales ácidos responsables de la acidez fija del vino corresponden a los ácidos tartárico, málico, láctico, succínico, cítrico y acético, siendo de interés en este estudio solamente el ácido láctico, cítrico y acético, los cuales influyen directamente en el perfil sensorial y estabilidad del producto final. La aplicación de HPLC con la columna de intercambio iónico, como la Shim-Pack SCR-101H, es ampliamente descrita debido a su alta capacidad para separar los compuestos orgánicos hidrosolubles sin necesidad de una derivatización de las muestras, lo que simplifica este análisis frente a métodos más complejos.

Diversos autores señalan que la combinación de una fase móvil ácida y un detector RID facilita la cuantificación de estos analitos, pese a que el detector no posee la sensibilidad del UV-Vis. Sin embargo, dado que los ácidos orgánicos carecen de compuestos cromóforos intensos, por lo cual el detector RID se presenta como una alternativa viable, económica y accesible para estudios rutinarios dentro del laboratorio. En un contexto teórico, se espera que el método proporcione tiempos de retención diferenciados y reproducibles para cada ácido analizado, permitiendo la generación de curvas de calibración con una buena correlación lineal dentro de los rangos de concentración establecidos.

La literatura reporta que la linealidad para este tipo de análisis suele mostrar coeficientes de correlación elevados ($R^2 > 0,995$), reflejando así una respuesta proporcional del detector frente al aumento de concentración en las muestras. En términos teóricos, se proyecta que el método propuesto lograra recuperaciones dentro de rangos aceptables para validación entre un 95–105 %, indicando que las interferencias de matriz no tendrían un efecto crítico en la cuantificación. Asimismo, se espera obtener una precisión adecuada mediante repetibilidad, considerando que el sistema cromatográfico bien calibrado tiende a mostrar variaciones menores entre inyecciones. Esto respalda el uso del método como herramienta confiable para caracterizar el perfil ácido del vino.

Al contrastar con valores descritos en investigaciones enológicas, se observa que el ácido láctico aumenta en vinos que han atravesado fermentación maloláctica. Estas tendencias son fundamentales para interpretar el comportamiento del vino, el ácido acético debiera encontrarse en concentraciones controladas para evitar defectos aromáticos asociados al vinagre, siendo un marcador indirecto del estado microbiológico del producto.

No obstante, también deben considerarse limitaciones al enfoque instrumental, el detector RID presenta una sensibilidad relativamente baja en comparación con otros detectores, lo que puede restringir su aplicabilidad en la determinación de analitos presentes en

contrataciones trazas, además de considerar el carácter no selectivo, el cual lo hace susceptible a interferencias de otros componentes de la matriz, tales como azúcares, alcoholes u otros solutos con un índice de refracción similar, los cuales pueden generar un aumento del ruido en la línea base o generar solapamientos en las señales. Estas condiciones podrían afectar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados.

Desde un enfoque teórico, estas restricciones podrían mitigarse mediante una adecuada preparación de las muestras, realizando etapas de filtración, dilución o pretratamientos específicos que reduzcan la interferencia de la matriz. Asimismo, futuras investigaciones podrán considerar la optimización de las condiciones cromatográficas entregadas, la incorporación de técnicas de extracción en fase sólida (SPE) o la evaluación comparativa de detectores con mayor sensibilidad y selectividad, tales como el UV-Vis o DAD, con el fin de ampliar el rango de aplicación del método propuesto.

En síntesis, desde una perspectiva teórica y basada en la literatura científica, el método HPLC-RID se establece como una herramienta sólida y aplicable para el método propuesto del análisis de ácidos orgánicos en vino, especialmente útil en laboratorios enológicos donde se requiera una técnica eficiente, de bajo costo y sin requerimientos de derivatización. La revisión conceptual respalda su utilidad para la caracterización del perfil ácido, monitorear la fermentación y evaluar la calidad del producto final, sentando bases claras para futuras aplicaciones experimentales y validaciones analíticas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estudio teórico desarrollado permitió cumplir el objetivo de diseñar y evaluar teóricamente el procedimiento analítico por HPLC-RID para la determinación de ácidos orgánicos en vino, estableciendo criterios metodológicos fundamentados en literatura y normas analíticas. A partir del análisis bibliográfico realizado, se concluye que el método propuesto posee una base conceptual sólida que reemplaza su factibilidad para la separación y cuantificación de los ácidos orgánicos de interés en la matriz compleja, contribuyendo directamente al control de calidad y a la evaluación enológica de las muestras de vino analizadas.

En base al objetivo metodológico del trabajo, la revisión bibliográfica permitió determinar que el uso de columnas intercambio iónico, junto a la fase móvil acidificada, forman un sistema cromatográfico ampliamente confiable para la separación y cuantificación de ácidos orgánicos. Esta propuesta representa una ventaja significativa frente a técnicas que requieren modificaciones químicas previas de las muestras para potenciar su respuesta al momento de leerlas. La literatura indica que el detector RID, aunque es menos sensible que otros sistemas como UV-Vis o MS, es adecuado para el análisis, debido a que permite obtener señales estables. Por lo cual, teóricamente, el método HPLC-RID es una alternativa viable, económica y eficiente para laboratorios enológicos, especialmente cuando se busca un balance entre simplicidad y calidad.

En consecuencia, a los fundamentos teóricos analizados permite proyectar la futura implementación experimental del método HPLC-RID propuesto, el cual tendrá resultados confiables y reproducibles para la cuantificación de ácidos orgánicos en vino. Por ese motivo el procedimiento diseñado tiene un gran potencial de ser utilizado como análisis práctico en laboratorio, así como en estudios preliminares de control de calidad enológico, fortaleciendo la formación académica y las necesidades enológicas.

Se recomienda que el laboratorio de química desarrolle la experiencia y validación experimental del método propuesto para la determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC-RID en vino, con el fin de confirmar las condiciones reales de los parámetros analíticos propuestos teóricamente. Esta etapa permitirá consolidar un procedimiento analítico validado y replicable, el cual contribuye a la formación de futuros profesionales.

En términos generales este trabajo establece un marco metodológico de referencia que puede servir como base para estudios experimentales posteriores, promoviendo la aplicación práctica de la cromatografía líquida de alta resolución y reforzando la importancia de los métodos instrumentales en química.

BIBLIOGRAFÍA Y FUENTES DE LA INFORMACIÓN

- [1] R.S. Jackson, *Wine Science: Principles and Applications*, Fifth Edition, *Wine Science: Principles and Applications*, Fifth Edition (2020) 1–1014. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-04224-6>.
- [2] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition*, *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition* 2 (2006) 1–441. <https://doi.org/10.1002/0470010398>.
- [3] A. Robles, M. Fabjanowicz, T. Chmiel, J. Płotka-Wasyłka, Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 120 (2019) 115630. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.115630>.
- [4] Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos | OIV, (n.d.). <https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis> (accessed October 19, 2025).
- [5] B.S. Chidi, F.F. Bauer, D. Rossouw, Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review, *J. Enol. Vitic* 39 (2018). <https://doi.org/10.21548/39-2-3164>.
- [6] Y. Han, J. Du, J. Li, M. Li, Quantification of the Organic Acids in Hawthorn Wine: A Comparison of Two HPLC Methods, *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 2150–2150 (2019) 2150. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112150>.
- [7] A. Kotani, Y. Miyaguchi, E. Tomita, K. Takamura, F. Kusu, Determination of Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection during Wine Brewing, *J Agric Food Chem* 52 (2004) 1440–1444. <https://doi.org/10.1021/JF0306486>.
- [8] B. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodríguez, M. Soto, M. Aguilera, S. Sandoval, GUÍA TÉCNICA No 1 “Se agradece la colaboración prestada por el Sr. Leonardo Merino de la National Food Administration de Suecia, para la elaboración de esta Guía” • Coordinación Edición, (n.d.).
- [9] M.W. Dong, *Modern HPLC for practicing scientists*, *Modern HPLC for Practicing Scientists* (2006) 1–286. <https://doi.org/10.1002/0471973106>.
- [10] S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, M.-L. Riekkola, *Liquid chromatography. Volume 1, Fundamentals and instrumentation*, (2017) 808.

- [11] HPLC for Pharmaceutical Scientists, HPLC for Pharmaceutical Scientists (2007). <https://doi.org/10.1002/0470087951>.
- [12] A. Gentili, F. Caretti, V.P. Fernández, LC–MS Applications in Environmental and Food Analysis, *Analytical Separation Science* (2015) 111–134. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.ASSEP006>.
- [13] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Instrumental Analysis Principles*, Veronika R. Meyer (2018) 429.
- [14] G. Purcaro, M. Beccaria, *Advanced Analytical Techniques in Food Analysis*, *J AOAC Int* 104 (2021) 251–252. <https://doi.org/10.1093/JAOACINT/QSAA159>.
- [15] Cromatógrafo Líquido Modular • Prominence • Shimadzu • Jenck, (n.d.). <https://www.jenck.com/productos/producto/prominence> (accessed November 29, 2025).
- [16] Depósito de fase móvil - Labster, (n.d.). <https://theory.labster.com/es/mobile-phase-reservoirs/> (accessed November 29, 2025).
- [17] Sistemas de bombeo Shimadzu LC-20 – Cromtek, (n.d.). <https://www.cromtek.cl/producto/sistemas-de-bombeo-shimadzu-lc-20/> (accessed November 29, 2025).
- [18] JERINGAS INYECCIÓN MANUAL HPLC | SUGELABOR, (n.d.). <https://www.sugelabor.es/jeringas-inyeccion-manual-hplc> (accessed November 29, 2025).
- [19] Consumibles – Columnas HPLC – cromlab-instruments.es, (n.d.). <https://cromlab-instruments.es/consumibles-columnas-hplc/> (accessed November 29, 2025).
- [20] Shimadzu SPD-20A Prominence UV/VIS Detector | Labconsort, (n.d.). <https://labconsort.com/products/shimadzu-spd-20a-detector> (accessed November 29, 2025).
- [21] LabSolutions TOC | Shimadzu Latin America, (n.d.). <https://www.shimadzu-la.com/an/products/total-organic-carbon-analysis/toc-analysis-software/labsolutions-toc/index.html> (accessed November 29, 2025).
- [22] Shimadzu Hplc Rheodyne Injector, For Industrial Use at ₹ 17500/piece in Ahmedabad, (n.d.). <https://www.indiamart.com/proddetail/hplc-rheodyne-injector-2852526791755.html?srsId=AfmBOoqJdu2y4JsZaaul2aKJcK4X1gBmu8dEPXOtWosRjMckh3tQeW-4> (accessed November 30, 2025).

- [23] Shimadzu SPD-M20A PDA Detector | Speck & Burke, (n.d.). <https://www.speckandburke.co.uk/products/reconditioned-instruments/hplc/detectors/shimadzu-spd-m20a-pda-detector/> (accessed November 30, 2025).
- [24] Shimadzu RID-10A Refractive Index Detector, (n.d.). <https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/shimadzu-rid-10a-refractive-index-detector-9031/?srsltid=AfmBOoov8zIYbBBs-fodejRWIVgDSxAQtFnut7WgENLK6kFN3tm6j> (accessed November 30, 2025).
- [25] Shimadzu Shim-pack SCR-101H; 300 x 7.9 - 228-07730-93 : UVISON.com, (n.d.). <https://uvison.com/chromatography-supplies/shimadzu-consumables-parts/shimadzu-consumables-parts-by-category/shimadzu-columns/shimadzu-lc-columns/shimadzu-dedicated-columns/shimadzu-shim-pack-scr-series/shimadzu-shim-pack-scr-101h-300-x-7.9-228-07730-93> (accessed November 29, 2025).
- [26] Organic Chemistry: A Tenth Edition, (n.d.).
- [27] C.B.F.S.A.S. T.W Graham Solomons, Organic Chemistry, 12th ed., 2016. <https://samya-s.github.io/jeechallenger/pdfs/Solomon-Fryhle's%20ORGANIC%20CHEMISTRY.pdf> (accessed October 25, 2025).
- [28] Ácido carboxílico - Wikipedia, la enciclopedia libre, (n.d.). https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_carbox%C3%ADlico (accessed November 29, 2025).
- [29] Fermentación Maloláctica del Vino - Aprender de Vino, (n.d.). <https://www.aprenderdevino.es/fermentacion-malolactica-vinos/> (accessed November 29, 2025).
- [30] Ácido cítrico 77-92-9 wiki - Es, (n.d.). <https://www.guidechem.com/encyclopedia/es/citric-acid-dic616.html> (accessed November 29, 2025).
- [31] Ácido acético - Concepto, fórmula, propiedades y aplicaciones, <https://Concepto.De/> (n.d.). <https://concepto.de/acido-acetico/> (accessed November 29, 2025).
- [32] How to Improve HPLC Resolution: Key Factors for Better Separation -, (n.d.). <https://www.mastelf.com/how-to-improve-hplc-resolution-key-factors-for-better-separation/> (accessed October 19, 2025).
- [33] Shim-pack SCR Series - Especificaciones : Shimadzu Latin America, (n.d.). <https://www.shimadzu-la.com/an/products/liquid-chromatography/hplc->

consumables/shim-pack-scr-series/spec.html?series=Shim-pack%20SCR%20Series (accessed October 20, 2025).

- [34] Shimadzu Packed Column for HPLC Shim-pack TM SCR-101H Instruction Manual ■ PRINCIPLE FOR SEPARATION AND PROCEDURE OF APPLICATION, (n.d.).
- [35] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition (2010) 1–912. <https://doi.org/10.1002/9780470508183>.
- [36] V. Pereira, J.S. Câmara, J. Cacho, J.C. Marques, HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples, *J Sep Sci* 33 (2010) 1204–1215. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200900784>;WGROU:STRING:PUBLICATION.
- [37] OIV, COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS - OIV Organic acids, (n.d.).

ANEXOS

ANEXO 1: Páginas de cotización de los estándares de interés

- https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sial/71251?srsltid=AfmBOor2DNMOt-0vq4nC9lJpPmDkfl7fjf6XojVw_uGu-YsJsagnlgqe
- https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/supelco/46937?srsltid=AfmBOop5irXFtO_SW1BEi3TLWJOuSBCd98RO7m0VoEIS1LpGBbjKk2F4
- <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sial/phr1071>

ANEXO 2: Protocolo analítico propuesto paso a paso

Condiciones del equipo:

- Técnica: HPLC.
- Tipo de bomba: Isocrático.
- Columna: Shim-Pack SCR-101H.
- Fase móvil: H₂SO₄ 0,005 – 0,01 N.
- Flujo: 0.6 mL/min.
- Temperatura columna: 30 °C.
- Detector: RID.
- Longitud de onda: 210 nm.
- Volumen de inyección: 20 μ L.

Materiales y equipos:

- HPLC con bomba isocrática, inyector manual, columna Shim-Pack SCR-101H, detector RID.
- Vasos y matraces aforados (10, 50, 100, 1000 mL).
- Filtros jeringa 0,22 – 0,45 μ m.

- Jeringas para inyección.
- Viales HPLC con tapas.
- Micropipeta (20–1000 μL).
- Agua ultrapura (Milli-Q).
- Ácidos estándar (ácido acético, láctico, cítrico) p.a. $\geq 99\%$.
- Ácido sulfúrico (para preparar la fase móvil).
- Baño ultrasónico o desgasificador.
- Agitador magnético.
- Refrigerador.
- Centrifuga.
- Equipo de protección personal.

Preparación de fase móvil:

1. Añadir 900 mL de agua ultrapura a un matraz aforado de 1 L.
2. Con cuidado pipetear 0.28 mL de H_2SO_4 concentrado, Ajustar hasta 1 L con agua ultrapura.
3. Filtrar mediante filtro 0,22 – 0,45 μm y desgasificar (ultrasonido 10–15 min o desgasificador en línea).
4. Etiquetar con fecha de preparación. Vida útil: preparación cada vez que se realice el análisis.

Preparación de soluciones estándar:

1. Preparar soluciones stock de 1000 mg/L de cada ácido en agua ultrapura.
2. De las soluciones stocks, preparar una curva de calibración con los puntos mostrados en la tabla de rangos de trabajo.
3. Preparar un estándar de control intermedio (ej. 100 mg/L).
4. Filtrar todos los estándares mediante filtro 0,22 – 0,45 μm y viales refrigerados a 4 °C (máx 1 semana).

Preparación de muestras:

1. Si la muestra es viscosa o contiene sólidos centrifugar 10 minutos a 4000 rpm y decantar el sobrenadante.
2. Filtrar 10 mL de muestra por jeringa con filtro 0,22 – 0,45 μm a vial HPLC.
3. Diluir la muestra si la respuesta está fuera de rango (ej. 1:10 con agua ultrapura). Registrar factor de dilución.

Puesta en marcha del equipo:

1. Encender HPLC, bomba y detector; poner columna y equilibrar con fase móvil a flujo 0.6 mL/min.
2. Desgasificar en línea y purgar líneas.
3. Esperar estabilización, esperando al menos 30 min o hasta que no exista ruido en la línea base.
4. Inyectar 3 inyecciones de agua ultrapura para limpiar y comprobar línea base, evitando interferencias.

Secuencia de la corrida:

1. Blanco (agua ultrapura), 1 inyección para estabilidad del equipo.
2. Estándar más bajo preparado de los ácidos orgánicos.
3. Estándares en orden ascendente.
4. Estándar de control, para evaluar la recuperación.
5. Muestras en duplicado.
6. Estándar intermedio al final de la corrida para comprobar deriva.
7. Finalizar con 1–2 inyecciones de agua y lavado de columna.

ANEXO 3: Carta Gantt

