



Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería Química

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA
CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA**

Eliana María Carranza Vásquez

Asesorado por la Inga. Alba Mariela Orozco López

Guatemala, septiembre de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA
CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA
TRABAJO DE GRADUACIÓN**

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

ELIANA MARÍA CARRANZA VÁSQUEZ
ASESORADA POR LA INGA. ALBA MARIELA OROZCO LÓPEZ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL I	Ing. Ángel Roberto Sic García
VOCAL II	Ing. Pablo Christian de León Rodríguez
VOCAL III	Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Raúl Eduardo Ticún Córdoba
VOCAL V	Br. Henry Fernando Duarte García
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
EXAMINADOR	Ing. César Alfonso García Guerra
EXAMINADOR	Ing. Estuardo Edmundo Monroy Benítez
EXAMINADOR	Ing. Jorge Rodolfo García Carrera
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA
CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 2 de julio de 2015.



Eliana María Carranza Vásquez

Guatemala, julio de 2016

Ingeniero

Carlos Salvador Wong

Director de Escuela de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería

Universidad de San Carlos de Guatemala

Reciba un cordial saludo. Deseándole éxitos en sus labores diarias, me dirijo ante esta Dirección, para hacer de su conocimiento que he revisado el trabajo de graduación de la estudiante Eliana María Carranza Vásquez que se identifica con carné No. 2011-14630 de la facultad de Ingeniería, USAC, de la carrera de Ingeniería Química, titulado: **"VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA"**

Considero que el mismo cumple con los requisitos necesarios para su aprobación, ya que su trabajo ha sido de gran utilidad para el Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua.

Sin otro particular:


Ing. Alba Mariela Orozco López
Colegiada 1742





Guatemala, 18 de agosto de 2016.
Ref. EIQ.TG-IF.043.2016.

Ingeniero
Carlos Salvador Wong Davi
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Wong:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **032-2015** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por la estudiante universitaria: **Eliana María Carranza Vásquez**.
Identificada con número de carné: **2011-14630**.
Previo a optar al título de **INGENIERA QUÍMICA**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA
CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por la Ingeniera Química: **Alba Mariela Orozco López**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Licda. Ingrid Lorena Benítez Pacheco
COORDINADORA DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



Ref.EIQ.TG.052.2016

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **ELIANA MARÍA CARRANZA VÁSQUEZ** titulado: **"VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Carlos Salvador Wong Davi
Director
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, septiembre 2016

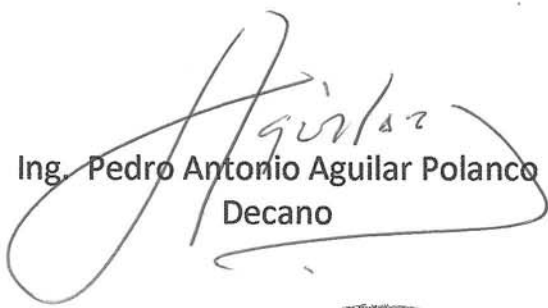
Cc: Archivo
CSWD/ale



DTG. 445.2016

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ACEITES Y GRASAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, PARA EL LABORATORIO REGIONAL DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD NESTLÉ ANTIGUA**, presentado por la estudiante universitaria: **Eliana María Carranza Vásquez**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:


Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
Decano

Guatemala, septiembre de 2016

/gdech



ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Por ser mi fortaleza, guía y soporte en todo momento, porque sin Él no hubiera logrado nada.
Virgen María	Por ser la madre que intercede por mí, me guía y protege mis pasos.
Mis padres	Luis Rodolfo Carranza Tejashún y Ana Cristina Vásquez Jiménez de Carranza, por su amor, apoyo y sacrificio en todos estos años. Por ser mi inspiración y ejemplo a seguir.
Mis hermanos	Mayra Lucrecia, Luis Pablo y Ana Lucia Carranza Vásquez, por el apoyo y motivación. Por ser mis amigos y estar conmigo en todo momento.
Mis sobrinos	Ignacio y Mateo Paredes Carranza, por inspirarme a ser mejor persona.
Mi familia	Por su apoyo incondicional y motivarme a alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios

Por brindarme sabiduría y fortaleza para alcanzar mis metas, sostenerme en sus brazos y guiar mis pasos en todo momento.

Virgen María

Por protegerme en mi caminar y guiar mis pasos.

Mis padres

Luis Rodolfo Carranza Tejashún y Ana Cristina Vásquez Jiménez de Carranza, por ser mis ejemplos a seguir, por brindarme su amor, apoyo y fortaleza en todo momento, por el sacrificio hecho para que logre mis metas. Gracias por su inspiración para superarme y guiar mis pasos.

Mis hermanos

Mayra Lucrecia, Luis Pablo y Ana Lucia Carranza Vásquez, mi hermano político Leonel Paredes, por estar a mi lado en todo momento, por brindarme su amor, apoyo y fortaleza, por inspirarme a ser mejor persona.

Mis abuelos

Por apoyarme y darme ánimos. Especialmente a mis abuelos Cristóbal Vásquez y María Jiménez por brindarme su amor y porque siempre quisieron verme alcanzar mis metas.

Mis tíos	Por apoyarme en todo momento y brindarme su cariño. Especialmente mis tíos Olga Jeannette y Mayron Saúl Vásquez Jiménez y tío político Eric Rosas.
Mis primos	Por su apoyo y cariño, por estar a mi lado siempre. Especialmente a mis primos Samuel y Kevin Rosas Vásquez y Ricardo Carranza.
Byron Antonio Vásquez Rodríguez	Por su apoyo, comprensión y paciencia durante mi formación académica.
Compañeros y amigos	Por su apoyo, cariño y por brindarme su amistad. Por estar a mi lado en todo momento.
Mi asesora	Alba Mariela Orozco López, por brindarme su apoyo, amistad y cariño. Por ayudarme en mi formación profesional y laboral.
Universidad de San Carlos de Guatemala	Por permitirme realizar mi formación profesional dentro de la Facultad de Ingeniería, especialmente en la Escuela de Ingeniería Química.
Nestlé Quality Assurance Center	Por brindarme su apoyo, amistad, cariño y brindarme una gran oportunidad en mi vida laboral. Por abrir sus puertas para que pudiera realizar este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN.....	XI
OBJETIVOS.....	XIII
HIPÓTESIS.....	XV
INTRODUCCIÓN	XVII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Método analítico	5
2.1.1. Métodos analíticos en química	5
2.1.2. Métodos analíticos que pueden ser validados	6
2.2. Validación de métodos	7
2.2.1. Pasos para la validación de métodos	8
2.2.2. Documento de validación de un método cuantitativo.....	8
2.3. Aceites y grasas	10
2.3.1. Reacción de auto oxidación en aceites y grasas	11
2.4. Antioxidantes	12
2.5. Cromatografía.....	14
2.5.1. Cromatografía líquida	16
2.5.1.1. Cromatografía en columna (CLC).....	16
2.5.1.2. Cromatografía líquida de fase inversa	18
3. METODOLOGÍA.....	21

3.1.	Variables	21
3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	22
3.2.1.	Campo de estudio	22
3.2.2.	Etapas de la investigación.....	22
3.2.3.	Ubicación del desarrollo de la investigación.....	23
3.3.	Recursos humanos disponibles	23
3.3.1.	Investigador.....	23
3.3.2.	Asesor	23
3.4.	Recursos materiales disponibles.....	23
3.4.1.	Documentos	24
3.4.2.	Equipo	24
3.4.3.	Materiales.....	24
3.4.4.	Cristalería	24
3.4.5.	Reactivos.....	25
3.5.	Técnica cuantitativa.....	25
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	28
3.6.1.	Análisis de la importancia de validar el método.....	28
3.6.2.	Recolección de los datos experimentales	28
3.6.3.	Análisis de los parámetros para validar el método	28
3.6.4.	Documentación de la validación del método	29
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	29
3.8.	Análisis estadístico.....	31
4.	RESULTADOS.....	33
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
	CONCLUSIONES.....	47
	RECOMENDACIONES	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	51

APÉNDICES	53
ANEXOS	61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Esquema general de métodos instrumentales	6
2.	Clasificación de los aceites y grasas	10
3.	Reacción de antioxidantes con radicales libres.....	12
4.	Antioxidantes fenólicos usados para preservar la calidad de los alimentos	13
5.	Diagrama de flujo para validar el método	27
6.	Curva de linealidad del antioxidante propil galato	33
7.	Curva de linealidad del antioxidante TBHQ.....	34
8.	Curva de linealidad del antioxidante BHA	35
9.	Curva de linealidad del antioxidante OG	36
10.	Curva de linealidad del antioxidante BHT	37
11.	Curva de linealidad del antioxidante AP.....	38

TABLAS

I.	Clasificación de las separaciones cromatográficas.....	14
II.	Definición y descripción de las variables del método a validar.....	21
III.	Definición y descripción de las variables respuesta del método a validar	21
IV.	Definición y descripción de las variables respuesta para validar el método	22
V.	Rango aproximado de concentraciones de las curvas utilizadas para evaluar la linealidad de cada antioxidante	30

VI.	Descripción figura 6	33
VII.	Descripción figura 7	34
VIII.	Descripción figura 8	35
IX.	Descripción figura 9	36
X.	Descripción figura 10	37
XI.	Descripción figura 11	38
XII.	Límite de cuantificación de cada uno de los antioxidantes	39
XIII.	Repetibilidad y porcentaje de recuperación para cada antioxidante en aceites	39
XIV.	Repetibilidad y porcentaje de recuperación para cada antioxidante en grasas	40
XV.	Incertidumbre de las mediciones en aceites	40
XVI.	Incertidumbre de las mediciones en grasas.....	41

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
AOX	Antioxidantes
AP	Antioxidante ascorbil-palmitato
BHA	Antioxidante butil-hidroxi-anisol
BHT	Antioxidante butil-hidroxi-tolueno
Conc.	Concentración
g	Gramos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Kg	Kilogramos
LoQ	Límite de cuantificación
mg	Miligramos
mL	Mililitros
OG	Antioxidante octil-galato
PG	Antioxidante propil galato
r	Repetibilidad
R²	Coeficiente de correlación
Rec	Recuperación
TBHQ	Antioxidante ter-butil-hidroxi-quinona
u	Incertidumbre típica
U	Incertidumbre expandida
µg	Microgramos

GLOSARIO

Aceite	Éster de glicerol líquido a temperatura ambiente e insoluble en agua.
Antioxidantes	Sustancias que permiten retrasar o eliminar el daño generado por la reacción de aceites o grasas con oxígeno.
COGUANOR NTG ISO/IEC 17025	Norma que define los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
Cromatografía	Método analítico-instrumental de separación, utilizado para identificar compuestos químicos.
Grasas	Éster de glicerol sólido a temperatura ambiente e insoluble en agua.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
Incertidumbre	Parámetro que caracteriza la dispersión de valores de una serie de mediciones.
Linealidad	Habilidad de un método analítico-instrumental para brindar un resultado proporcional a la concentración del analito en muestras de un rango dado.

Límite de cuantificación	Magnitud mínima que se puede determinar con un nivel de precisión y exactitud aceptable.
Método analítico	Serie de pasos definidos para obtener un resultado específico.
Método instrumental	Serie de pasos de interacciones materia-energía en los que no sucede reacción química necesariamente.
NQAC-Antigua	Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua.
Porcentaje de recuperación	Grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor de referencia.
Repetibilidad	Variabilidad que un método analítico puede presentar en un periodo corto cuando se realiza en las mismas condiciones.
Validación de métodos	Confirmación por pruebas y evidencias objetivas para verificar que los métodos son aptos para el fin previsto.

RESUMEN

El presente informe detalla el proceso de validación de un método cuantitativo para la determinación de antioxidantes en aceites y grasas por cromatografía líquida de alta resolución. El objetivo es determinar los parámetros: linealidad del método, límite de cuantificación, repetibilidad, porcentaje de recuperación e incertidumbre de las mediciones, para los antioxidantes: PG, TBHQ, BHA, OG, BHT y AP.

Antes de iniciar el proceso de validación, se determinaron los valores que debía cumplir cada uno de los parámetros; la curva de linealidad debía dar como resultado un coeficiente de correlación mayor a 0,995, el límite de cuantificación debía ser igual o menor a 2 mg/Kg, la repetibilidad debía ser igual o menor a 10 % y el porcentaje de recuperación debía encontrarse entre el 85 %-110 %.

Posterior a la definición de targets, se escogió el aceite y la grasa que se utilizarían como matrices (se utilizó aceite de oliva, aceite de palma y aceite vegetal hidrogenado). Dichas matrices fueron contaminadas con una cantidad conocida de cada uno de los antioxidantes con el fin de evaluar cada uno de los parámetros que se debían verificar.

El primer parámetro que se verificó fue la linealidad del método para cada uno de los antioxidantes, para lo cual se realizó una curva de señal (área de pico del antioxidante en el cromatograma) en función de la concentración. Posterior a la evaluación de la linealidad se determinó el límite de cuantificación de los antioxidantes, dicho parámetro fue calculado a partir de la curva de

linealidad. Se estableció que el límite de cuantificación es el punto más bajo en donde es lineal el método.

Para evaluar la repetibilidad (precisión), porcentaje de recuperación (exactitud) e incertidumbre del método se realizó el procedimiento de extracción-cuantificación de los antioxidantes en cada una de las matrices en dos concentraciones. Este proceso se realizó en diferentes días y por diferentes analistas. Con los datos obtenidos en la parte experimental se evaluó cada uno de los parámetros necesarios para verificar el método.

Las curvas de señal en función de la concentración de cada uno de los antioxidantes tienen un coeficiente de correlación R^2 mayor a 0,995, en un rango de 0,2 µg/mL – 50 µg/mL para los antioxidantes fenólicos PG, TBHQ, BHA, OG y BHT y en un rango de 0,3 µg/mL – 85 µg/mL para el antioxidante AP, por lo que se determinó que el método es lineal para todos los antioxidantes que establece el método. El punto más bajo de la curva de linealidad del método fue establecido como el límite de cuantificación, para los antioxidantes fenólicos es de 2 mg/Kg y para el antioxidante AP es de 3 mg/Kg. La repetibilidad del método oscila entre 1,10 %- 19,00 % entre los diferentes antioxidantes, el porcentaje de recuperación fue mayor al 85 % en las dos matrices y la incertidumbre expandida no supera el 32 %.

Luego de haber determinado cada uno de los parámetros de validación se verificó que estos cumplieran con los targets establecidos por el laboratorio para validar el método, una vez verificados los resultados se realizó la documentación que respalda que el método ha sido validado y se dio por finalizado el proceso.

OBJETIVOS

General

Validar el método de determinación cuantitativa de antioxidantes en aceites y grasas utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para el Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua.

Específicos

1. Evaluar la linealidad del método para cada uno de los antioxidantes que establece el método.
2. Determinar los límites de cuantificación para cada uno de los antioxidantes que establece el método.
3. Evaluar la repetibilidad del método utilizando un análisis estadístico.
4. Determinar el porcentaje de recuperación de los antioxidantes que establece el método.
5. Realizar un análisis estadístico para conocer la incertidumbre del método.

Hipótesis

Hipótesis nula:

El límite de cuantificación para cada antioxidante no será de 2 mg/kg. Los parámetros de la validación de repetibilidad e incertidumbre no tendrán un rango de 5 % a 30 %. La recuperación no será entre 85 % y 110 %.

Hipótesis alternativa:

El límite de cuantificación para cada antioxidante será de 2 mg/kg. Los parámetros de la validación de repetibilidad e incertidumbre tendrán en un rango de 5 % a 30 %. La recuperación será entre 85 % y 110 %.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de validar métodos para determinar compuestos químicos en las diferentes industrias, ha provocado que la cromatografía líquida de alta resolución sea una de las herramientas de la ingeniería química más utilizadas, ya que permite cuantificar diferentes compuestos químicos.

Uno de los problemas que afronta la industria alimenticia, es la auto oxidación de los alimentos; en la actualidad se agregan a aceites y grasas compuestos que disminuyen o eliminan este problema. Los aditivos utilizados son llamados antioxidantes.

En el Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua (NQAC Antigua) se debe trabajar con métodos analíticos validados que certifiquen la confiabilidad de los resultados que se reportan. Asimismo debe mantener una mejora continua del sistema de gestión de calidad para que no se tengan desviaciones en los análisis que se realizan, ya que en la industria alimenticia es primordial brindar al consumidor un producto de alta calidad.

La validación de los métodos analíticos que se realizan dentro del NQAC Antigua es uno de los parámetros para cumplir con el sistema de gestión de calidad Nestlé; de la misma manera es un requisito establecido en la norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025, y el laboratorio debe cumplirla para mantener la acreditación en dicha norma, de esta manera se certifica la confiabilidad de los resultados que se obtienen.

En el NQAC Antigua, no se tenía un método validado que permitiera la cuantificación de antioxidantes en aceites y grasas; por lo que se validó un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de los antioxidantes: propil galato (PG), terc-butilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA), octil galato (OG), butilhidroxitolueno (BHT) y ascorbil palmitato (AP)

El presente informe tiene como finalidad detallar los parámetros que se calcularon para la validación del método de determinación de antioxidantes en grasas y aceites en el NQAC Antigua, por lo que se presenta de manera específica el procedimiento que se realizó para validar el método.

1. ANTECEDENTES

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una herramienta utilizada en la validación de distintos métodos químicos analíticos, ya que permite determinar cuantitativamente diferentes compuestos; por tal razón, puede aplicarse en distintas industrias que requieran de análisis químico: farmacéutica, agropecuaria, agroquímica, alimenticia, entre otros.

En la Facultad de Ingeniería y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han realizado como trabajos de graduación diversas validaciones de métodos analíticos los cuales utilizan cromatografía líquida de alta resolución.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, María Estela Palencia Rodas presentó el trabajo titulado *“Implementación y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución, para el análisis simultáneo de siete vitaminas hidrosolubles”*, y Ana Mary Rodríguez Mondal presentó *“Implementación y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta, para la determinación de dos tetraciclinas en leche fresca de vaca”*; en ambos casos para obtener el título de químico biólogo.

Para obtener el título de ingeniero químico en 2004, Marco Tulio Green Olmedo realizó el trabajo de graduación *“Importancia de la validación del proceso de mezclado de triclosan en crema dental, por medio de la determinación con cromatografía líquida de alta resolución”*. En el trabajo mencionado se detalla la validación de un análisis químico que permitiera

conocer el porcentaje de triclosan en crema dental para compararlos con los límites de especificación.

En 1993, Claudia Regina Rodríguez Vargas realizó el trabajo de graduación titulado *“Procedimiento para la validación de métodos analíticos, aplicado a cromatografía líquida de alta precisión”*, para optar al título de ingeniero químico. En dicho trabajo se describe cómo se realizó la validación de un método cuantitativo para determinar: ácido ascórbico, bitartrato de fenilefrina, ácido acetilsalicílico y maleato de clorofeniramina en un producto farmacéutico; los parámetros determinados fueron: la selectividad, exactitud, precisión, linealidad y robustez.

En noviembre de 2008, Juan Luis Arriola Illescas, ingeniero químico por la Universidad de San Carlos de Guatemala, presentó como trabajo de graduación *“Validación del método de determinación de ácidos grasos libres”* el cual consiste en cuantificar los ácidos grasos para determinar el índice de acidez de diferentes productos alimenticios y también indica cómo evitar que sufran hidrólisis la cual favorece la auto oxidación de los mismos.

José Estuardo Lira Sosa realizó en 2012 el trabajo de graduación *“Validación de un método para análisis de un fungicida (Propineb) por cromatografía líquida de alta resolución para seguimiento de la mejora continua en un sistema de gestión de calidad”*, para obtener el título de ingeniero químico. Para llevar a cabo dicha validación realizó pruebas de exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, límites de detección y cuantificación y robustez utilizando estándares y muestras de propineb.

Con relación a la metodología a validar, la Asociación de Químicos Analistas Oficiales (AOAC), organización encargada de establecer métodos de

análisis químico a nivel mundial, estableció el *AOAC Official Method 983.15*; que consiste en utilizar cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de antioxidantes fenólicos (BHA, BHT, DG, Ionox-100, NDGA, OG, PG, TBHQ y THBP) en aceites, grasas y aceite de mantequilla. El método a validar es equivalente al establecido por la AOAC, sin embargo, también es aplicado para la determinación del antioxidante AP.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Método analítico

Un método analítico es una serie de pasos definidos que se realizan para obtener un resultado específico.

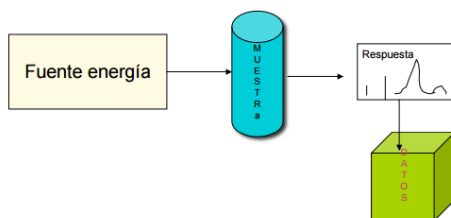
2.1.1. Métodos analíticos en química

Los métodos utilizados en química analítica pueden clasificarse en:

- Métodos químicos: están basados en interacciones materia-materia, es decir, producen reacciones químicas. Estos a su vez pueden clasificarse en:
 - Análisis cualitativo
 - Análisis cuantitativo

- Métodos instrumentales: están basados en interacciones materia-energía, para los cuales no tiene que suceder necesariamente una reacción química (en algunas ocasiones si puede haber reacción). Los métodos instrumentales pueden clasificarse en:
 - Ópticos
 - Electroquímicos
 - Otros

Figura 1. **Esquema general de métodos instrumentales**



Fuente: Universidad Autónoma de Madrid. *Lección 1: Química analítica instrumental*.
www.uam.es/personal_pdi/ciencias/lhh345a/InstrumentalLecc1.pdf. Consulta: 25 de abril de 2015.

2.1.2. **Métodos analíticos que pueden ser validados**

En un laboratorio analítico se pueden realizar diferentes clases de métodos analíticos que pueden ser validados: métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el laboratorio.

- **Método normalizado**

Un método normalizado es aquel que es publicado por un organismo de normalización internacional, nacional o regional. Estos deben de ser realizados exactamente como han sido publicados.

- **Método no normalizado**

Los métodos no normalizados son aquellos de los que no existe una publicación por un organismo nacional, internacional o regional; sin embargo, son métodos que han sido desarrollados por otros laboratorios.

- **Método desarrollado por el laboratorio**

Los métodos desarrollados por el laboratorio son aquellos definidos por una persona capacitada dentro del laboratorio para cumplir con un requerimiento establecido por el cliente.

2.2. Validación de métodos

La validación es la confirmación por pruebas y evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico. Para validar un método analítico se deben tener documentos que demuestren científicamente que se tiene la capacidad de cumplir con un fin previsto.

En un laboratorio analítico se valida con el fin de brindar a sus clientes resultados exactos, precisos, confiables y que sean reproducibles. La norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 establece en el inciso 5.4.5.2: *“El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera de alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe de registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto”*.¹

La validación de un método es requerida cuando: se va a utilizar un nuevo método, se van a implementar mejoras en un método o se incorporaran adaptaciones locales, antes de usar un método existente que se ha extendido a nuevas matrices.

¹ ISO/IEC 17025. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. p.22.

2.2.1. Pasos para la validación de métodos

- Plan de validación
Se establece con los parámetros de validación del método. Se establece el diseño experimental (materiales, recursos, equipos, reactivos) y el número de análisis a realizar.
- Desarrollo de pruebas experimentales
Se lleva a cabo el desarrollo analítico del método, se realizan todas las pruebas experimentales necesarias.
- Evaluación de resultados
Se analizan los resultados obtenidos en el desarrollo experimental y se verifica que el método cumpla con el fin establecido.
- Documento de validación
Se pone por escrito todo el proceso que se realizó para la validación.

2.2.2. Documento de validación de un método cuantitativo

El documento de validación debe presentar la evidencia que demuestra que el método es capaz de cumplir con el propósito requerido. En este documento se debe establecer cada uno de los parámetros de validación necesarios; también, se debe describir detalladamente los procedimientos experimentales realizados y sus resultados; asimismo, debe contar con los cálculos realizados para la validación.

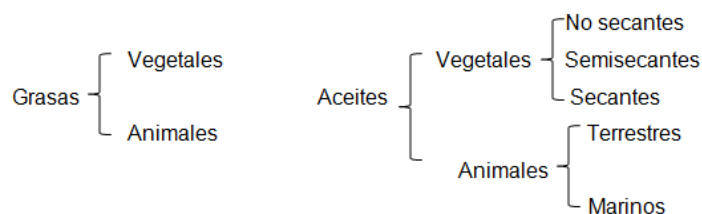
- Partes básicas de un documento de validación
 - Descripción del método
 - Grado de validación
 - Alcance de aplicación
 - Requisitos analíticos
 - Características del rendimiento del método:
 - Selectividad: capacidad del método para distinguir entre el analito y otras sustancias.
 - Linealidad: habilidad del método para obtener un resultado proporcional a la concentración del analito en muestras de rango dado.
 - Límites de detección y cuantificación: hacen referencia a la magnitud mínima que es detectable y en que posee un nivel aceptable de precisión y exactitud determinado compuesto.
 - Precisión: según la norma ISO 5725-1, es el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones específicas. Puede ser representada como desviación estándar o por repetibilidad. La repetibilidad es la precisión que se obtiene cuando se realiza un mismo análisis en las mismas condiciones, representa la variabilidad que el método puede presentar en un periodo corto.

- Exactitud o porcentaje de recuperación: representa el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor de referencia.
 - Incertidumbre: parámetro que caracteriza la dispersión de los valores obtenidos, puede ser expresada por incertidumbre típica que se expresa como desviación estándar o como incertidumbre expandida, que es expresada con un intervalo de confianza del 95%.
- Capacidad del método

2.3. Aceites y grasas

Los aceites y grasas “*son ésteres de ácidos carboxílicos superiores con el alcohol trihídrico, glicerol*”². La diferencia entre estos compuestos se debe a su estado físico, ya que los aceites son líquidos a temperatura ambiente, mientras las grasas son sólidas o semisólidas. Se clasifican por su origen y sus propiedades físicas y químicas.

Figura 2. **Clasificación de los aceites y grasas**



Fuente: NOLLER, Carl. *Química orgánica*. p. 149.

² Definición por Michael Eugene Chevreul (1786-1889). NOLLER, Carl. *Química orgánica*. p. 150.

Los ésteres del glicerol tienen la fórmula general $\text{RCOOCH}_2\text{CH}(\text{OCOR}')\text{CH}_2\text{OCOR''}$, usualmente llamados glicéridos. Las grasas y aceites no son una mezcla de glicéridos simples que tienen los tres grupos hidroxilos esterificados con el mismo ácido graso, son una mezcla de glicéridos mixtos que en cada molécula de glicerol se esterifica con más de un ácido graso.

Con la hidrólisis enzimática parcial se ha demostrado que los grupos hidroxilo secundarios de las moléculas del glicerol están esterificadas con ácidos insaturados, disminuyendo el punto de fusión, por lo que predominan en los aceites. Por otro lado los grupos acilo saturados predominan en las grasas.

2.3.1. Reacción de auto oxidación en aceites y grasas

La auto oxidación es la reacción que sufren los compuestos orgánicos cuando están en contacto con el oxígeno atmosférico, este proceso también puede iniciarse por la presencia de luz y puede ser catalizado por metales traza; generalmente se da por la presencia de radicales libres en los compuestos.

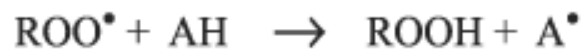
Los aceites y grasas poseen cadenas alquílicas que contienen enlaces dobles que son susceptibles a la auto oxidación, específicamente en las posiciones alílicas. Los malos olores, ranciedad y pérdida de propiedades organolépticas de los compuestos mencionados se deben a la reacción de auto oxidación de la insaturación que poseen; dando así la formación de peróxidos que degradan la molécula a una mezcla compleja de aldehídos, cetonas y ácidos volátiles. Algunos de los peróxidos formados pueden llegar a ser tóxicos.

La auto oxidación puede ser disminuida o eliminada mediante la adición de antioxidantes que estabilicen por resonancia las moléculas de los aceites y grasas. Los aceites vegetales son más resistentes a la auto oxidación que los de origen animal, ya que contienen un antioxidante natural (α -toco ferol).

2.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son reactivos químicos que permiten retrasar o eliminar el daño generado por la auto oxidación de compuestos. Algunos reactivos químicos que actúan como antioxidantes son los fenoles y derivados de las aminas. Para evitar la oxidación, los antioxidantes ceden átomos de hidrógeno al radical hidroxilo.

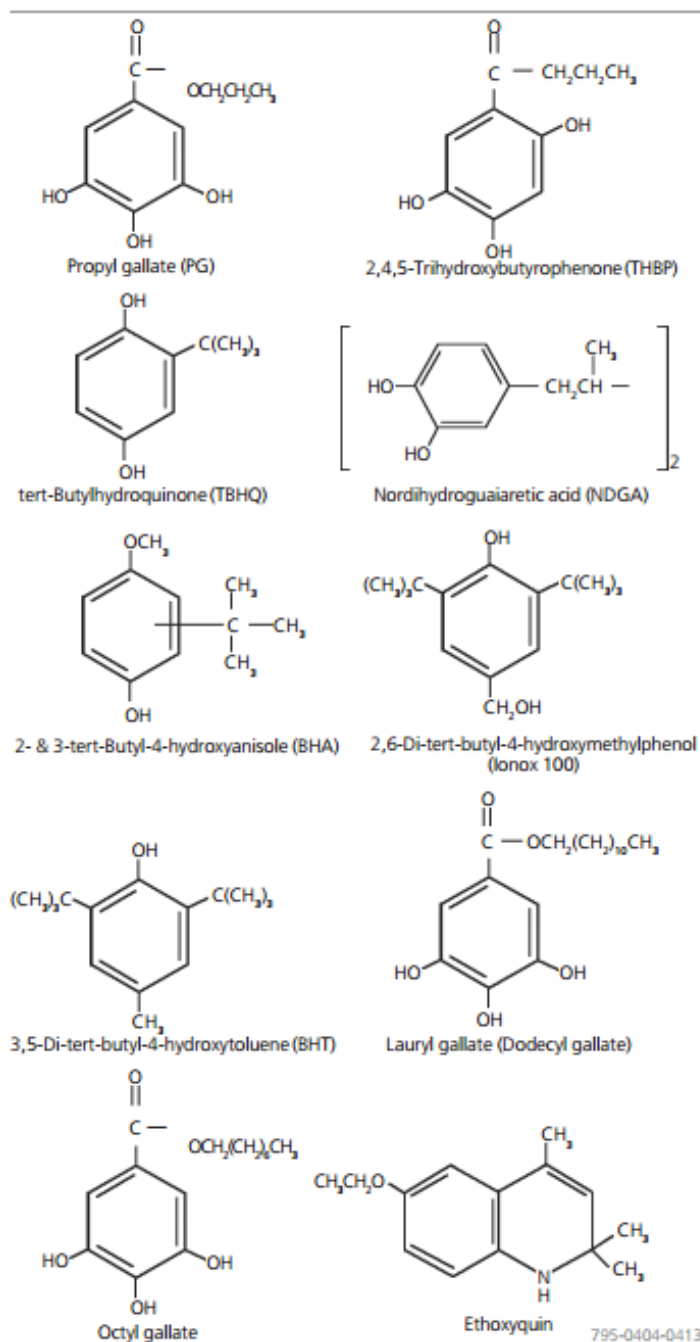
Figura 3. **Reacción de antioxidantes con radicales libres**



Fuente: RAMALHO, Valéria. *Antioxidantes usados en aceites, grasas y alimentos grasos*. www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400023. Consulta: 25 de abril de 2015.

En la industria alimenticia es necesario agregar aditivos que funcionen como antioxidantes a los productos, ya que al momento de oxidarse un alimento disminuye su valor nutritivo y se pierden las propiedades organolépticas de sabor, olor y apariencia. Los antioxidantes más utilizados como aditivos en alimentos son el BHA, BHT, PG y el α -tocoferol (vitamina E).

Figura 4. **Antioxidantes fenólicos usados para preservar la calidad de los alimentos**



Fuente: SUPELCO. *Antioxidantes en alimentos*. www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Application_Notes/t395078.pdf. Consulta: 25 de abril de 2015.

2.5. Cromatografía

La cromatografía es un método de separación que se utiliza para aislar e identificar compuestos químicos presentes en una mezcla. En todos los métodos cromatográficos se emplean dos fases: una estacionaria y otra móvil. A través de la fase estacionaria, se transportan los compuestos por medio de la fase móvil que se mantienen fluyendo. Las separaciones realizadas se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los componentes de la muestra. Los componentes que se desean separar por el método cromatográfico deben ser solubles en la fase móvil y deben tener la capacidad de interactuar con la fase estacionaria.

- Clasificación de los métodos cromatográficos

La fase móvil utilizada puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido.

Tabla I. **Clasificación de las separaciones cromatográficas**

Nombre	Fase móvil	Fase estacionaria	Descripción
Partición (CLL)	Líquido	Líquido	La separación realiza partición simple entre dos fases líquidas inmiscibles.
Adsorción (CLS)	Líquido	Sólido	La capacidad de retención de la fase estacionaria se basa en fuerzas superficiales físicas.
Intercambio iónico (CII)	Líquido	Sólido	Los componentes iónicos de la muestra se separan por intercambio selectivo de iones contrarios de la fase estacionaria.
Permeación de geles (CE)	Líquido	Líquido	Se utilizan empaques de exclusión como fase estacionaria y produce una clasificación de moléculas.
CGL	Gas	Líquido	Se absorben en un sólido poroso.
CGS	Gas	Sólido	Se absorben en un sólido poroso.

Fuente: SKOOG, Douglas. *Análisis Instrumental*. p 698.

- Análisis cualitativo y cuantitativo por medios cromatográficos

La cromatografía puede utilizarse como una herramienta para la separación de especies químicas relacionadas; asimismo, puede utilizarse para la identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos analizados.

- Análisis cualitativo: el único parámetro cualitativo que se puede obtener mediante cromatografía es el tiempo de retención o posición en la fase estacionaria; dicho parámetro permite identificar diferentes compuestos de mezclas que contienen un número limitado de especies, cuyas identidades se conocen.
- Análisis cuantitativo: la cromatografía permite un análisis de comparación entre el analito y las soluciones patrón; la comparación puede hacerse entre la altura o el área de los picos, ya que *“los detectores de cromatografía suelen operarse en forma diferencial con respecto a la concentración del soluto o a la velocidad de flujo de masa.”*³
 - Análisis basado en la altura de los picos: la altura del pico se obtiene realizando una línea perpendicular a la base de éste. Para realizar un análisis basado en las alturas de los picos se debe controlar cuidadosamente la temperatura de la columna, velocidad de flujo, velocidad de inyección de la muestra y se debe evitar sobrecargar la columna.
 - Análisis basado en el área de los picos: las áreas de los picos constituyen un parámetro analítico más exacto que el análisis de alturas.

³ WILLARD, Hobart. *Métodos Instrumentales de análisis*. p. 467.

2.5.1. Cromatografía líquida

Se denomina cromatografía líquida al proceso cromatográfico en el que se utiliza como fase móvil un líquido. Los métodos cromatográficos líquidos pueden ser en columna o planos.

2.5.1.1. Cromatografía en columna (CLC)

Los métodos cromatográficos de adsorción, partición e intercambio iónico se realizan por medio de columnas. Dichos métodos no poseen inestabilidad térmica y permiten analizar distintos compuestos.

En el caso de la cuantificación de los compuestos iónicos, compuestos lábiles naturales, polímeros y compuestos poli-funcionales de alto peso molecular se realizan por cromatografía líquida en columnas. La eficiencia del método puede aumentarse cuando se tiene una disminución en el tamaño de la partícula de los empaques.

Los sistemas de CLC que permiten procesar partículas de diámetros pequeños (10 μm aproximadamente) requieren tecnología de instrumentos complejos y reciben el nombre de Cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography, HPLC*).

La instrumentación general de la HPLC consta de:

- Depósito de disolvente para la fase móvil. Un equipo de HPLC debe contar con recipientes que contengan disolventes; generalmente poseen un sistema desgasificador para evitar que

se formen burbujas en la columna y el sistema de detección no se vea afectado.

- Bomba para el disolvente (puede ser más de una). La selección del tipo y cantidad de bombas depende del tipo de columna de separación, el detector utilizado, si se lleva una elución isocrática o de gradientes, los límites mínimos de detección y la precisión de la cuantificación. Los tipos principales de bombas son:
 - De desplazamiento
 - Reciprocante
 - Recipiente a presión
- Precolumna. Sirve para pre saturar la fase móvil con la fase estacionaria evitando la eliminación de la fase estacionaria del empaque de la columna analítica.
- Columna de protección. Se utiliza para evitar la contaminación de la columna de separación.
- Manómetro. Se utiliza para medir la presión de entrada a la columna.
- Dispositivo de muestreo o inyección. Se utiliza para introducir la muestra a la columna; en sistemas HPLC se utilizan válvulas giratorias para las muestras. Las válvulas de *“corredera se mueven en un plano entre dos piezas de politetrafluoroetileno. Se coloca la muestra en la válvula por medio de jeringa”*⁴. La inyección de la muestra puede realizarse por una jeringa y un tabique obturador de silicona, neopreno o teflón.
- Columna de separación. Las columnas utilizadas por sistemas de HPLC se fabrican de vidrio (resisten únicamente hasta presiones de 560 psi) o de acero inoxidable. El tipo de empaque depende del

⁴ SKOOG, Douglas. *Análisis Instrumental*. p. 725.

tipo de columna, existen empaques de sílice, polímeros sintéticos y otros basados en el gel de sílice.

- Detector. El detector que se debe utilizar depende de la naturaleza del compuesto que se desea cuantificar.

Los detectores más comunes en HPLC son:

- Detectores de radiación ultravioleta
 - Detector de longitud de onda fija
 - Detector de longitud de onda variable
 - Detector de arreglo de diodos
- Detector de índice de refracción
 - Tipo de deflexión
 - Tipo Fresnel
- Detector de fluorescencia. Solo puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.
- Detector de fluorescencia inducida por láser
 - Según fuente de excitación
 - Según el sistema óptico
- Detectores electroquímicos
 - Detector amperométrico
 - Detector conductimétrico
 - Detector potenciométrico

2.5.1.2. Cromatografía líquida de fase inversa

La cromatografía líquida de fase inversa utiliza una fase estacionaria hidrofóbica enlazada (C_{18} generalmente); asimismo, utiliza una fase móvil polar. Los más utilizados son metanol y acetonitrilo.

Se utiliza un compuesto polar porque eluyen de manera rápida; y a medida que se incrementa el carácter hidrofóbico del soluto, la retención es mayor. Se recomienda que se utilice un solvente con baja polaridad, ya que de esta manera será mayor su fuerza como eluyente.

3. METODOLOGÍA

3.1. Variables

Durante la investigación, recopilación y ordenamiento de datos, fue necesario contar con las siguientes variables para evaluar el método y realizar su validación.

Tabla II. **Definición y descripción de las variables del método a validar**

Núm.	Variable	Unidad	Constante	Variable
1	Masa de la muestra (aceite o grasa)	<i>g</i>		X
2	Concentración del antioxidante en la solución estándar	$\mu g/mL$		X
3	Área de pico del antioxidante en la muestra	-		X
4	Área de pico del antioxidante en la solución estándar	-		X
5	Volumen de solvente agregado a la muestra	<i>mL</i>	X	

Fuente: elaboración propia.

Tabla III. **Definición y descripción de las variables respuesta del método a validar**

Núm.	Variable	Unidad	Constante	Variable
1	Concentración del antioxidante	<i>mg/Kg</i>		X

Fuente: elaboración propia.

Tabla IV. **Definición y descripción de las variables respuesta para validar el método**

Núm.	Variable	Unidad	Constante	Variable
1	Linealidad de la curva de calibración	-		X
2	Límite de cuantificación	<i>mg/Kg</i>	X	
3	Repetibilidad del método	-		X
4	Porcentaje de recuperación	%		X
5	Incertidumbre del método	-	X	

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

El estudio se limita únicamente a la validación del método de determinación cuantitativa de los antioxidantes: BHA, BHT, OG, PG, TBHQ y AP, utilizando cromatografía líquida de alta resolución para el Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua.

3.2.1. Campo de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua. Los campos de estudio involucrados fueron análisis cuantitativo, análisis instrumental y fisicoquímico.

3.2.2. Etapas de la investigación

- Experimentación
- Recopilación de datos
- Análisis de datos obtenidos
- Verificación de cumplimiento de los parámetros establecidos

- Documentación de validación

3.2.3. Ubicación del desarrollo de la investigación

Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua, km 46,5 carretera a Ciudad Vieja, Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

3.3. Recursos humanos disponibles

Los recursos humanos con los que se contó para llevar a cabo el proyecto fueron los siguientes:

3.3.1. Investigador

El desarrollo del método que se validó, el manejo de datos obtenidos luego de realizar la experimentación y su posterior interpretación, estuvo a cargo de la estudiante de ingeniería química Eliana María Carranza Vásquez.

3.3.2. Asesor

El desarrollo del proyecto estuvo asesorado por la ingeniera química Alba Mariela Orozco López.

3.4. Recursos materiales disponibles

Los recursos materiales con los que se contó para desarrollar el proyecto fueron los siguientes:

3.4.1. Documentos

Dentro del NQAC Antigua se tiene un protocolo para realizar el método que se validó, de igual forma se tiene una instrucción con los requisitos que se deben cumplir para validar un método.

3.4.2. Equipo

Para realizar la parte experimental de la validación se utilizó un sistema HPLC Alliance WATERS e2695 fase inversa, con detección UV de 255 nm y 280 nm. El equipo también posee una bomba cuaternaria, auto muestreador, detector de arreglo de diodos y una columna de cromatografía WATERS Symmetry C18 5µm, 150 x 3.9 mm.

3.4.3. Materiales

- Agitador de tubos
- Viales de 40 mL
- Centrífuga de tubos
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Filtros de 0,2 µm de poro y 25 mm de diámetro
- Plancha con agitador magnético
- Agitadores magnéticos
- Viales de 2 mL para HPLC

3.4.4. Cristalería

Se utilizó cristalería de diferentes volúmenes:

- Vaso de precipitación
- Probeta
- Pipeta volumétrica
- Balón aforado

3.4.5. Reactivos

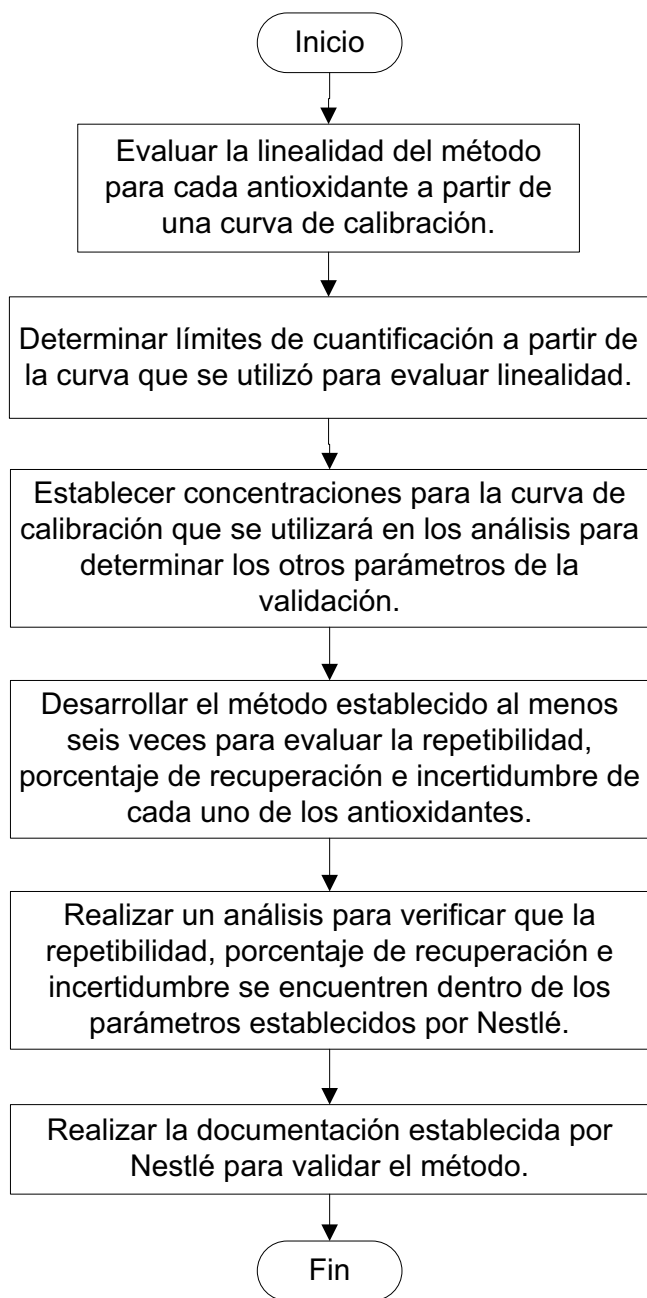
- Aceite de oliva
- Aceite de palma (como grasa sólida)
- Aceite vegetal hidrogenado (como grasa sólida)
- Hidroxibutilanisol (BHA)
- Butil hidroxitolueno (BHT)
- Propil galato (PG)
- Octil galato (OG)
- Ascorbil palmitato (AP)
- Terc-butilhidroquinona (TBHQ)
- Metanol para cromatografía líquida
- Ácido D-(-)-iso-ascórbico 99 %
- Ácido cítrico anhidro 99,5 %
- Ácido ortofosfórico 85 %
- Acetonitrilo para cromatografía líquida
- Agua para cromatografía

3.5. Técnica cuantitativa

Se trabajó con base en una técnica cuantitativa ya que se establecieron límites de cuantificación de los antioxidantes evaluados; también, se evaluó la linealidad del método, repetibilidad, porcentaje de recuperación y con base en

estos datos se realizó un análisis estadístico para conocer la incertidumbre de las medidas realizadas en el método. En la figura 5 se establece el proceso utilizado para validar el método.

Figura 5. **Diagrama de flujo para validar el método**



Fuente: elaboración propia.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

La recolección y ordenamiento de la información se realizó en el siguiente orden:

3.6.1. Análisis de la importancia de validar el método

El método de determinación cuantitativa de antioxidantes en aceites y grasas por cromatografía líquida de alta resolución del Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua, debe estar validado para brindar resultados confiables a los clientes; ellos deben asegurarse que el producto que utilizan no causará daño a sus consumidores, ya que los antioxidantes pueden considerarse sustancias tóxicas en concentraciones altas.

3.6.2. Recolección de los datos experimentales

Se llevó a cabo una serie de repeticiones del método de determinación de antioxidantes en aceites y grasas por HPLC, con el objetivo de tener los suficientes datos para realizar un análisis que permitiera evaluar la confiabilidad de la realización del método dentro del Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua.

3.6.3. Análisis de los parámetros para validar el método

Después de realizar la parte experimental se procedió a evaluar la linealidad del método, los límites de cuantificación, la repetibilidad, el porcentaje de recuperación y un análisis estadístico para conocer la incertidumbre del método; lo cual se hizo para cada uno de los antioxidantes que describe el método.

3.6.4. Documentación de la validación del método

Al tener todos los datos necesarios se realizó el documento que respalda que se ha validado el método, en dicho documento se describe: el método, el grado de validación, la linealidad, los límites de cuantificación, la repetibilidad, porcentaje de recuperación y la incertidumbre de la cuantificación de cada uno de los antioxidantes evaluadas.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Para la validación se trabajó con aceite de oliva, aceite de palma y aceite vegetal hidrogenado. La parte experimental consistió en contaminar las matrices con una concentración conocida de cada uno de los antioxidantes que establece el método para después extraerlos y cuantificarlos, lo cual se realizó con el fin de conocer la eficiencia y exactitud del método.

El primer parámetro que se debía verificar era la linealidad del método, lo cual se debía realizar para cada uno de los antioxidantes (PG, TBHQ, BHA, OG, BHT y AP). La linealidad de cada uno de los antioxidantes fue calculada utilizando una curva de área en función de la concentración, para determinar si el método era lineal en cada uno de los antioxidantes se debía evaluar su coeficiente de correlación R^2 , el cual debía ser mayor a 0,995.

Tabla V. **Rango aproximado de concentraciones de las curvas utilizadas para evaluar la linealidad de cada antioxidante**

Antioxidante	Concentraciones para la curva (µg/mL)								Número de repeticiones de la curva
PG	0,18	1,50	3,00	6,00	12,00	24,00	36,00	50,00	3
TBHQ									
BHA									
OG									
BHT									
AP	0,30	3,00	6,00	12,00	24,00	48,00	72,00	85,00	

Fuente: elaboración propia.

Posterior a la verificación de la linealidad se determinaron los límites de cuantificación para cada uno de los antioxidantes. Para evaluar dicho parámetro se escogió una de las metodologías de Nestlé, la cual consiste en escoger el punto más bajo de la curva señal (área de pico del antioxidante en el cromatograma) en función de la concentración en donde es lineal el método.

Los parámetros de repetibilidad y porcentaje de recuperación del método fueron evaluados a partir de los datos obtenidos en la parte experimental la cual consistió en contaminar muestras de aceite y grasa con los antioxidantes PG, TBHQ, BHA, OG, BHT y AP. Para determinar que se tenían resultados confiables se contaminaron muestras a una concentración alta y a una concentración baja; la extracción y cuantificación de los antioxidantes se realizó en diferentes días para poder evaluar que, independientemente de las condiciones ambientales y del analista, el procedimiento establecido por Nestlé brindaba resultados verídicos.

Los resultados de la parte experimental se tabularon en el programa Microsoft Excel. Concluida la parte experimental del proceso se inició la

documentación que respalda la validación del método. Inicialmente se verificó que los parámetros de linealidad, límite de cuantificación, repetibilidad y porcentaje de recuperación cumplieran con los targets establecidos por Nestlé, parámetros que fueron verificados utilizando el programa Q-Stat. Ya verificados los targets, se procedió a realizar el documento de validación del método; para la realización de dicho documento se utilizó el programa Microsoft Word y los gráficos se realizaron en el programa Qti-Plot.

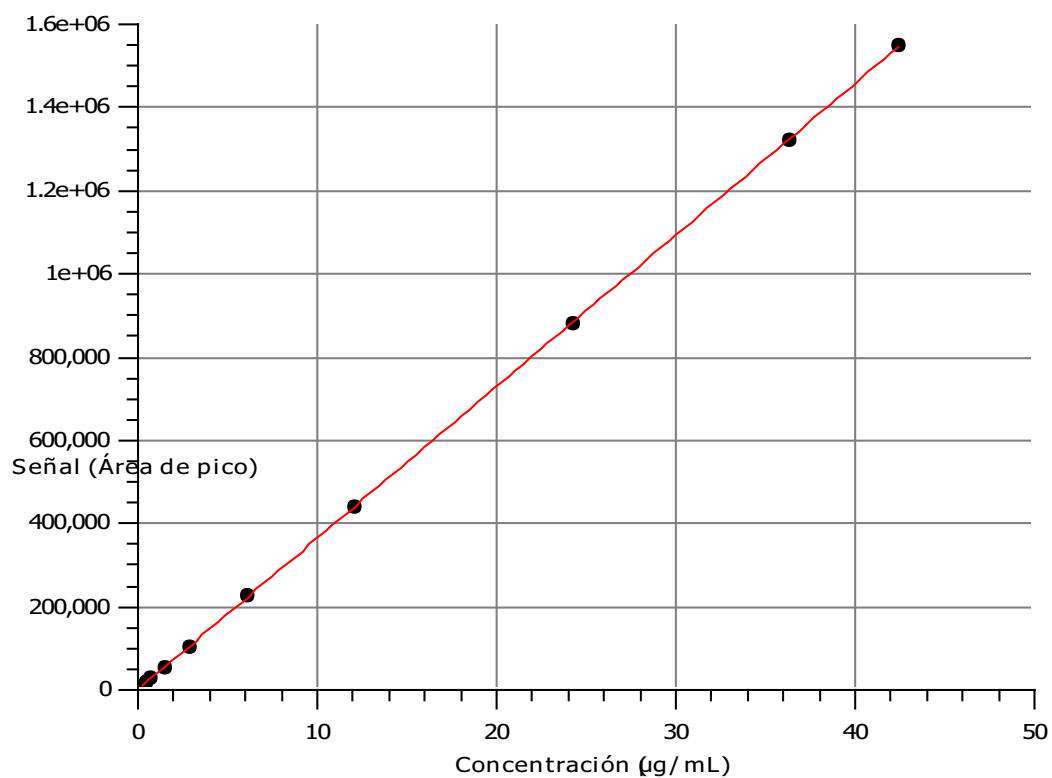
3.8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para conocer la incertidumbre del método. Se realizó un método simplificado propuesto por V.J. Barwick y S.L.R. Ellison (Ref. 2). Este análisis utiliza una estadística robusta y brinda un nivel de confianza del 95 %.

Los resultados obtenidos por el análisis fueron calculados utilizando el software Q-Stat, programa utilizado internamente para realizar validaciones, verificaciones, entre otros.

4. RESULTADOS

Figura 6. **Curva de linealidad del antioxidante propil galato**



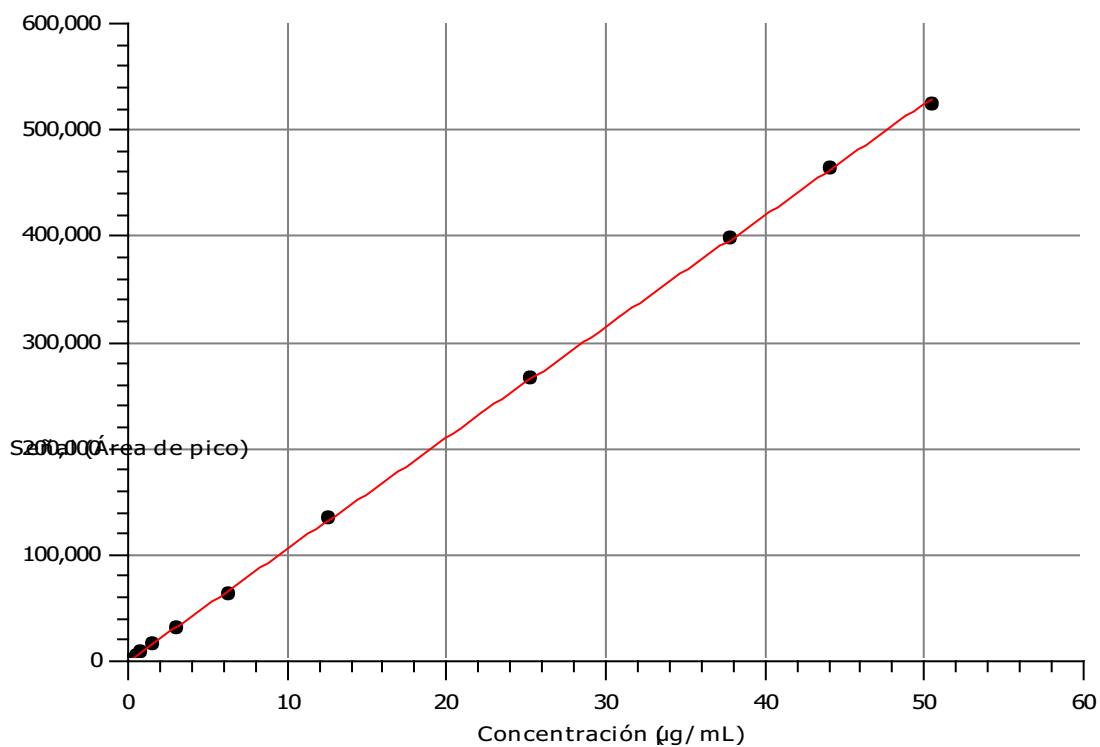
Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Descripción figura 6**

Color	Modelo matemático	R ²	Incerteza máxima (variable dependiente)	Incerteza máxima (variable independiente)	Intervalo de validez
	$Señal = 9,29E2 + 3,64E4C$	0,999	$\pm 5,62E1$	$\pm 1,06E3$	[0,18 - 42]

Fuente: elaboración propia.

Figura 7. **Curva de linealidad del antioxidante TBHQ**



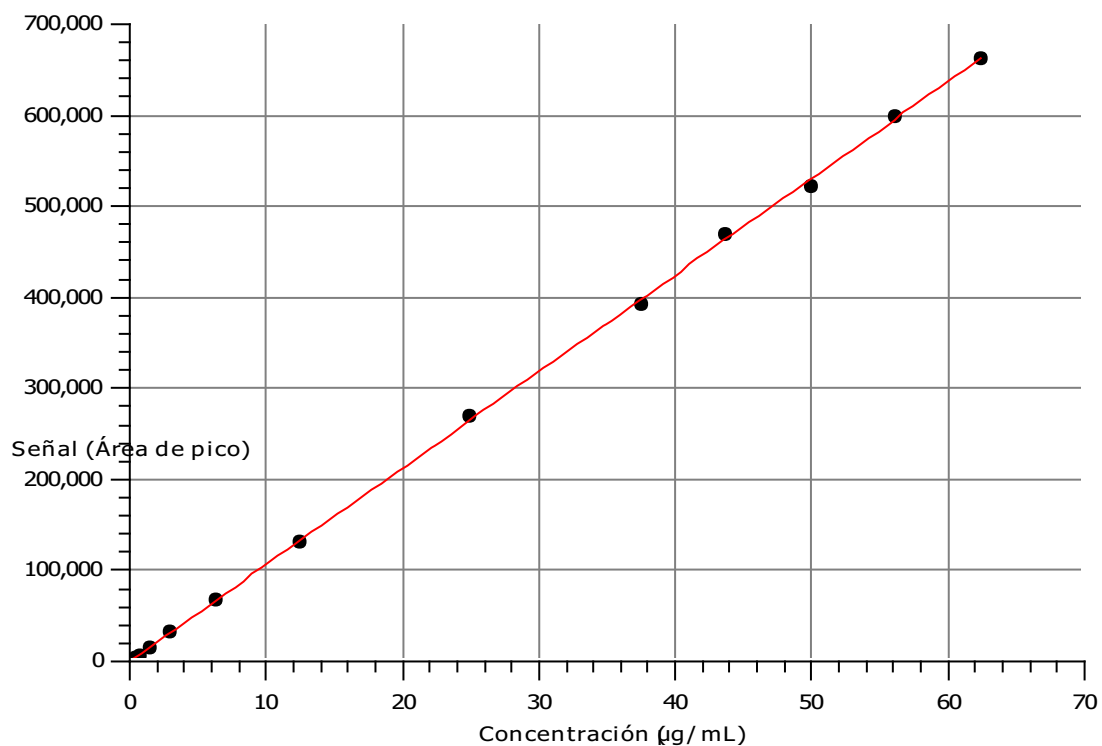
Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Descripción figura 7**

Color	Modelo matemático	R ²	Incerteza máxima (variable dependiente)	Incerteza máxima (variable independiente)	Intervalo de validez
	$Señal = 7,01E2 + 1,05E4C$	0,999	± 3,79E1	± 9,00E2	[0,18 - 50]

Fuente: elaboración propia.

Figura 8. **Curva de linealidad del antioxidante BHA**



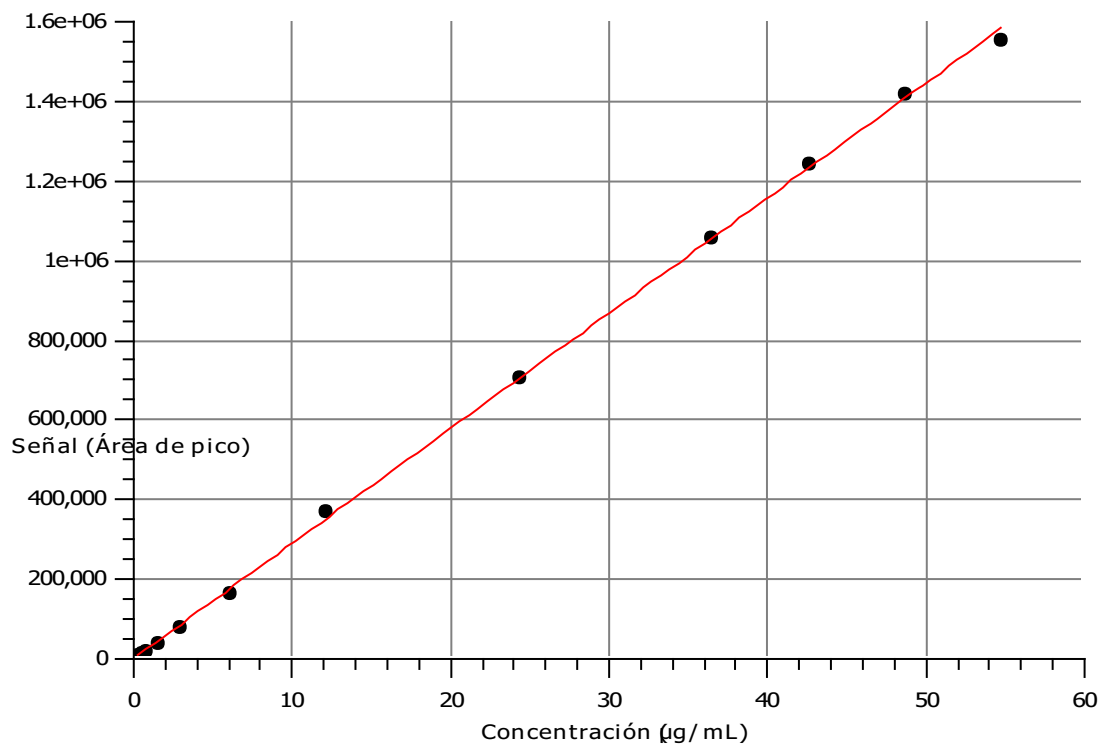
Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. **Descripción figura 8**

Color	Modelo matemático	R ²	Incerteza máxima (variable dependiente)	Incerteza máxima (variable independiente)	Intervalo de validez
	$Señal = 1,88E2 + 1,06E4C$	0,999	$\pm 4,30E1$	$\pm 1,34E3$	[0,18 - 62]

Fuente: elaboración propia.

Figura 9. **Curva de linealidad del antioxidante OG**



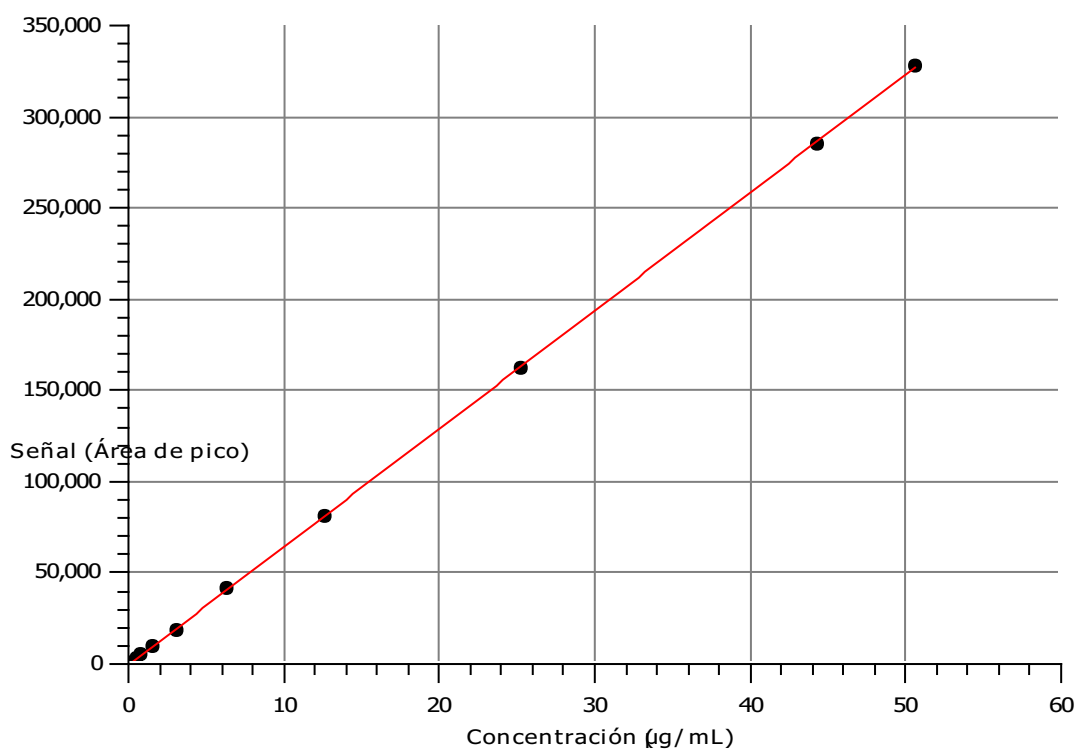
Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. **Descripción figura 9**

Color	Modelo matemático	R ²	Incerteza máxima (variable dependiente)	Incerteza máxima (variable independiente)	Intervalo de validez
	$Señal = 1,11E3 + 2,89E4C$	0,999	± 1,81E2	± 5,05E3	[0,24 - 54]

Fuente: elaboración propia.

Figura 10. **Curva de linealidad del antioxidante BHT**



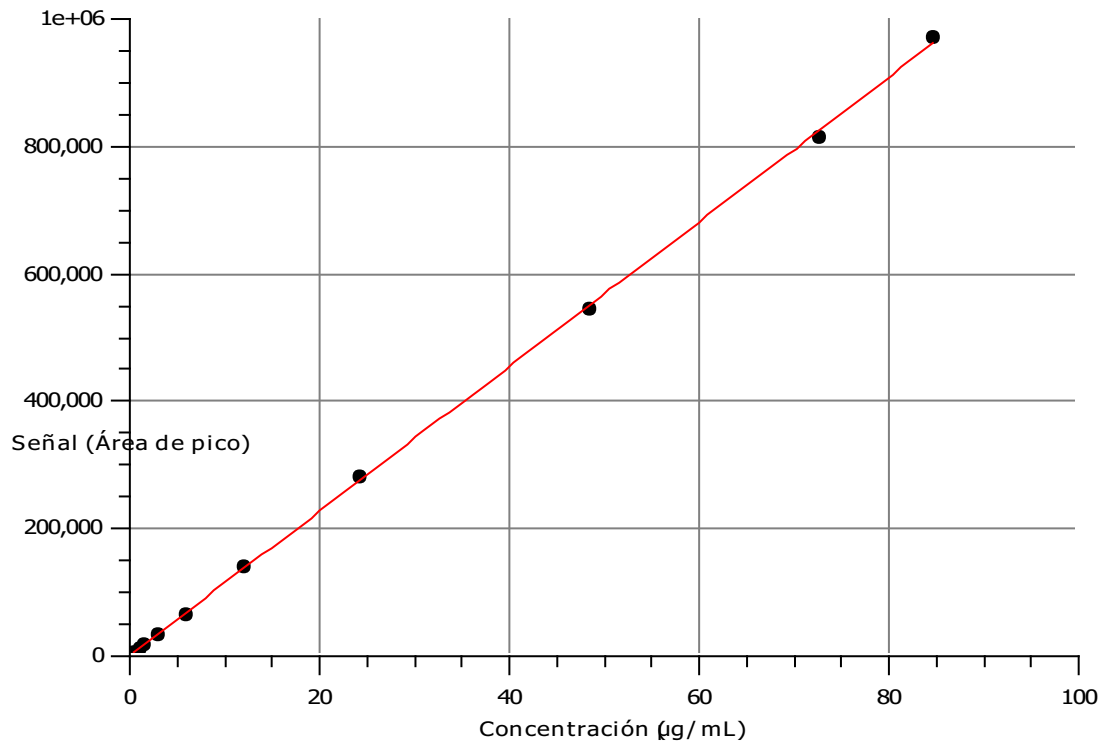
Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Descripción figura 10**

Color	Modelo matemático	R ²	Incerteza máxima (variable dependiente)	Incerteza máxima (variable independiente)	Intervalo de validez
	$\text{Señal} = -1,08E2 + 6,46E3C$	0,999	$\pm 1,25E1$	$\pm 2,89E2$	[0,25 - 50]

Fuente: elaboración propia.

Figura 11. **Curva de linealidad del antioxidante AP**



Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Descripción figura 11**

Color	Modelo matemático	R ²	Incerteza máxima (variable dependiente)	Incerteza máxima (variable independiente)	Intervalo de validez
	$Señal = 1,13E3 + 1,13E4C$	0,999	$\pm 5,24E1$	$\pm 1,97E3$	[0,36 – 85]

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Límite de cuantificación de cada uno de los antioxidantes**

Antioxidante	Límite de cuantificación (mg/Kg)
PG	2,00
TBHQ	2,00
BHA	2,00
OG	2,00
BHT	2,00
AP	3,00

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIII. **Repetibilidad y porcentaje de recuperación para cada antioxidante en aceites**

Antioxidante	Concentración	Repetibilidad (r)	Repetibilidad (r%)	Porcentaje de recuperación
PG	Alta	5,94	2,50	97,80
	Baja	0,39	2,70	99,90
TBHQ	Alta	7,31	3,10	99,60
	Baja	2,38	15,00	110,20
BHA	Alta	9,00	4,00	94,10
	Baja	0,85	6,50	90,40
OG	Alta	2,67	1,10	98,40
	Baja	1,16	8,60	93,80
BHT	Alta	10,85	5,00	90,50
	Baja	1,69	11,20	96,80
AP	Alta	18,07	4,00	93,20
	Baja	0,41	1,70	86,60

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIV. **Repetibilidad y porcentaje de recuperación para cada antioxidante en grasas**

Antioxidante	Concentración	Repetibilidad (r)	Repetibilidad (r%)	Porcentaje de recuperación
PG	Alta	12,75	5,00	106,00
	Baja	0,96	6,60	100,90
TBHQ	Alta	47,69	19,00	104,70
	Baja	2,15	14,80	101,00
BHA	Alta	13,60	5,60	101,60
	Baja	0,34	2,50	94,70
OG	Alta	7,04	2,80	104,70
	Baja	0,80	5,70	96,70
BHT	Alta	12,95	5,90	90,90
	Baja	1,03	7,60	94,90
AP	Alta	25,21	5,30	99,60
	Baja	1,86	7,00	94,90

Fuente: elaboración propia.

Tabla XV. **Incertidumbre de las mediciones en aceites**

Antioxidante	Concentración	Incertidumbre típica u (%)	Incertidumbre expandida U (%)
PG	Alta	2,86	5,71
	Baja	2,63	5,27
TBHQ	Alta	3,66	7,32
	Baja	13,71	27,41
BHA	Alta	3,67	7,35
	Baja	8,30	16,59
OG	Alta	3,94	7,87
	Baja	11,87	23,74
BHT	Alta	7,34	14,69
	Baja	15,94	31,87
AP	Alta	6,26	12,52
	Baja	8,64	17,28

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVI. Incertidumbre de las mediciones en grasas

Antioxidante	Concentración	Incertidumbre típica u (%)	Incertidumbre expandida U (%)
PG	Alta	7,39	14,78
	Baja	7,00	14,01
TBHQ	Alta	14,34	28,67
	Baja	11,16	22,33
BHA	Alta	4,70	9,39
	Baja	9,29	18,58
OG	Alta	3,70	7,41
	Baja	12,78	25,55
BHT	Alta	6,34	12,69
	Baja	4,44	8,89
AP	Alta	8,80	17,60
	Baja	5,11	10,22

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo del trabajo fue validar el método cuantitativo para determinar antioxidantes en aceites y grasas utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución, para el Laboratorio Regional del Aseguramiento de la Calidad Nestlé Antigua. Para realizar la validación se debían verificar los parámetros de linealidad del método, límite de cuantificación, repetibilidad, porcentaje de recuperación e incertidumbre de las mediciones.

Las figuras entre la 6 y la 11 representan el comportamiento de la señal (área de pico de antioxidante en la muestra) en función de la concentración; las gráficas muestran que dicho comportamiento es lineal en un rango de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ – 50 $\mu\text{g/mL}$ para los antioxidantes fenólicos PG, TBHQ, BHA, OG y BHT. El comportamiento de señal en función de la concentración para el antioxidante AP es lineal en un rango de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ – 85 $\mu\text{g/mL}$. Los coeficientes de correlación R^2 de las curvas es mayor a 0,995, lo cual indica que el método es lineal para cada uno de los antioxidantes estudiados.

El valor del límite de cuantificación es el punto más bajo en donde la curva de señal en función de concentración es lineal. La tabla 12 presenta el límite de cuantificación de los antioxidantes evaluados; como se puede observar para los antioxidantes fenólicos el límite es de 2 mg/Kg, mientras que para el antioxidante AP el límite es de 3 mg/Kg.

En la tabla 13 se encuentran descritos los valores de repetibilidad y porcentaje de recuperación para aceites. Un valor alto de repetibilidad $r\%$ indica que el método es menos preciso; por lo que se puede decir que la repetibilidad

es mejor en concentraciones altas que en concentraciones bajas, de igual forma se puede observar que la mejor precisión se obtuvo en el antioxidante OG en concentraciones altas y que se tuvo menor precisión para el antioxidante TBHQ en concentraciones bajas. En relación al porcentaje de recuperación, se observa que la mejor recuperación fue para el antioxidante TBHQ en bajas concentraciones y la menor recuperación se dio en el antioxidante AP en bajas concentraciones.

Los valores de repetibilidad y porcentaje de recuperación para grasas se describen en la tabla 14 la cual indica que al igual que en los aceites la repetibilidad es mejor en concentraciones altas que en concentraciones bajas. La mejor precisión se obtuvo para el antioxidante BHA en concentraciones bajas, mientras que la precisión menor fue para el antioxidante TBHQ en ambas concentraciones. Respecto al porcentaje de recuperación fue menor en el antioxidante BHT en concentraciones altas y la mejor recuperación fue para el PG en concentraciones altas.

Comparando los resultados de repetibilidad y porcentaje de recuperación de ambas matrices se puede afirmar que se tiene una mejor precisión al evaluar los antioxidantes en aceites y un porcentaje de recuperación mayor al evaluar grasas.

La incertidumbre expandida representa la dispersión de los valores en un intervalo de confianza del 95 %, los valores calculados de incertidumbre se presentan en las tablas 15 y 16. En el caso de los aceites se puede observar que la dispersión es mayor en los antioxidantes TBHQ y BHT en concentraciones bajas, mientras que la menor dispersión se da para el antioxidante PG en ambas concentraciones. En el caso de las grasas se tiene

una mayor dispersión para el antioxidante TBHQ en ambas concentraciones y una menor dispersión para el antioxidante OG en concentraciones altas.

Los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros de validación cumplen con los requisitos establecidos por Nestlé; por lo que después de haber realizado la documentación que respalda la validación, se puede realizar el método de determinación cuantitativa de antioxidantes en aceites y grasas por cromatografía líquida de alta resolución en muestras comerciales.

CONCLUSIONES

1. Se validó el método de determinación cuantitativa de antioxidantes en aceites y grasas utilizando cromatografía líquida de alta resolución.
2. El método es lineal para cada uno de los antioxidantes que establece el método.
3. El límite de cuantificación para los antioxidantes fenólicos (PG, TBHQ, BHA, OG y BHT) es de 2 mg/Kg; para el antioxidante AP el límite de cuantificación es de 3 mg/Kg.
4. El porcentaje de la repetibilidad para cada uno de los antioxidantes se encuentra entre 1 % - 19 %.
5. El porcentaje de recuperación para cada uno de los antioxidantes se encuentra entre 85 % - 110 %.
6. La dispersión de los valores, expresada como incertidumbre expandida, se encuentra entre el 5 % - 32 %.

RECOMENDACIONES

1. Realizar verificaciones del método al menos dos veces al año para cerciorarse de que el método sigue siendo apto para la cuantificación de antioxidantes en aceites y grasas.
2. El procedimiento de extracción-cuantificación de los antioxidantes debe realizarse de la misma manera que en la validación del método.
3. Utilizar materiales de referencia que permitan determinar el desempeño del método validado.
4. Realizar una nueva validación del método cuando se desee ampliar el rango de concentración, evaluar una nueva matriz o realizar modificaciones al procedimiento experimental, para cumplir con el inciso 5.4.5. Validación de métodos de la norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025.

BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC. Oficial Method 983.15: *Phenolic Antioxidants in oils, fats, and butter oil, Liquid Chromatographic Method*. E.E.U.U.: AOAC, 1999. 3 p.
2. BARWICK, v.j. y ELLISON, s.l.r. VAM Project 3.2.1 *Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*. Versión 5.1. E.E.U.U.: LGC/VAM, 2000. 28 p.
3. CORTÉZ, Rubén Darío. *Cromatografía líquida de alta eficiencia* [en línea]
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400023>. [Consulta. 24 de abril 2015].
4. HERNÁNDEZ, Lucas. *Introducción al análisis instrumental*. España: Ariel, 2002. 464 p.
5. ISO. 5725-1: *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. E.E. U.U: ISO/IEC, 2011. 37 p.
6. ISO/IEC. 17025: *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Venezuela: ISO/IEC, 2005. 38 p.

7. NOLLER, Carl R. *Química orgánica*. Toral, María Teresa (trad). 4a ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1977. 163 p.
8. RAMALHO, Valéria Cristina. *Antioxidantes utilizados en aceites, grasas y alimentos grasos* [en línea].
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Qu_es>. [Consulta: 25 de abril 2015].
9. SKOOG, Douglas A. *Análisis instrumental*. 4ª ed. México: McGraw-Hill, 1998. 1 400 p.
10. SUPELCO. *Antioxidantes en alimentos* [en línea].
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Application_Notes/t395078.pdf>. [Consulta: 25 de abril de 2015].
11. Universidad Autónoma de Madrid. *Lección 1: química analítica Instrumental* [en línea].
<https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/lhh345a/InstrumentalLec1.pdf>. [Consulta: 25 de abril de 2015].
12. WILLARD, Hobart. *Métodos instrumentales de análisis*. Gomez, Antonio (trad.). 2ª ed. México: Compañía Editorial Continental, 1988. 1 037 p.
13. YOUNGSON, Robert. *Antioxidantes y radicales libres*. Algora, Manuel (trad). Volumen 132 de Vida Natural. España: Gráficas Cofás, S.A. 1994. 175 p.

APÉNDICES

Apéndice 1. Ecuaciones utilizadas

- Ecuación 1: desviación estándar de repetibilidad del método cuando se realizan duplicados en cada repetición.

$$SD(r) = 1,0484 * Med\{x_{i1} - x_{i2}\}$$

Ref. 2

Donde:

$SD(r)$ = desviación estándar de repetibilidad

Med = mediana de los datos obtenidos

x_{i1} y x_{i2} = los dos resultados de cada repetición

- Ecuación 2: coeficiente de variación de repetibilidad del método.

$$CV(r) = \frac{SD(r)}{Med} * 100$$

Ref. 2

Donde:

$CV(r)$ = coeficiente de variación de repetibilidad

$SD(r)$ = desviación estándar de repetibilidad

Med = mediana de los datos obtenidos

- Ecuación 3: repetibilidad r .

$$r = 2.772 * SD(r)$$

Ref. 2

Donde:

r = repetibilidad

$SD(r)$ = desviación estándar de repetibilidad

- Ecuación 4: repetibilidad $r\%$.

$$r\% = 2.772 * CV(r)$$

Ref. 2

Donde:

$r\%$ = porcentaje de repetibilidad

$CV(r)$ = coeficiente de variación de repetibilidad

- Ecuación 5: desviación estándar de la reproducibilidad intermedia del método cuando se realizan duplicados en cada repetición.

$$SD(iR) = \sqrt{SD(b)^2 + \frac{1}{2}SD(r)^2}$$

Ref. 2

Donde:

$SD(iR)$ = desviación estándar de la reproducibilidad intermedia

$SD(b)$ = desviación estándar de los promedios de los duplicados

$SD(r)$ = desviación estándar de repetibilidad

- Ecuación 6: coeficiente de variación de la reproducibilidad intermedia.

$$CV(iR) = \frac{SD(iR)}{Med} * 100$$

Ref. 2

Donde:

$CV(iR)$ = coeficiente de variación de reproducibilidad intermedia

$SD(iR)$ = desviación estándar de la reproducibilidad intermedia

Med = mediana de los datos obtenidos

- Ecuación 7: Recuperación.

$$Rec = \frac{Med}{Spiked}$$

Ref. 2

Donde:

Rec = recuperación

Med = mediana de los datos obtenidos

$Spiked$ = concentración agregada del antioxidante

- Ecuación 8: desviación estándar de recuperación.

$$SD(Rec) = 1,0484 * Med\{Rec_{i1} - Rec_{i2}\}$$

Ref. 2

Donde:

$SD(Rec)$ = desviación estándar de la recuperación

Med = mediana de los datos obtenidos

$Rec_{i1} - Rec_{i2}$ = los dos resultados de recuperación de cada repetición

- Ecuación 9: desviación estándar de recuperación corregida.

$$SD(Rec)_{Corrected} = \sqrt{\frac{(1 - Rec)^2}{2} + SD(Rec)^2}$$

Ref. 2

Donde:

$SD(Rec)_{Corrected}$ = desviación estándar de recuperación corregida

Rec = recuperación

$SD(Rec)$ = desviación estándar de la recuperación

- Ecuación 10: desviación estándar relativa de recuperación.

$$RSD(Rec)_{Corrected} = \frac{SD(Rec)_{Corrected}}{Rec}$$

Ref. 2

Donde:

$RSD(Rec)_{Corrected}$ = desviación estándar relativa de recuperación

$SD(Rec)_{Corrected}$ = desviación estándar de recuperación corregida

Rec = recuperación

- Ecuación 11: incertidumbre típica.

$$u = Median * \sqrt{CV(iR)^2 + RSD(Rec)_{corrected}^2}$$

Ref. 2

Donde:

u = incertidumbre típica

$Median$ = mediana de los resultados

$CV(iR)$ = coeficiente de variación de la reproducibilidad intermedia

$RSD(Rec)_{corrected}$ = desviación estándar relativa de la recuperación

- Ecuación 12: incertidumbre expandida.

$$U = 2 * u$$

Ref. 2

Donde:

U = incertidumbre expandida

u = incertidumbre típica

Apéndice 2. Datos obtenidos para la linealidad

PG		TBHQ		BHA		OG		BHT		AP	
Conc. (µg/mL)	Señal	Conc. (µg/mL)	Señal	Conc. (µg/mL)	Señal	Conc. (µg/mL)	Señal	Conc. (µg/mL)	Señal	Conc. (µg/mL)	Señal
0,18	7,21E+03	0,19	2,54E+03	0,19	2,06E+03	0,24	9,00E+03	0,25	1,55E+03	0,36	4,19E+03
0,24	9,71E+03	0,25	2,68E+03	0,25	2,57E+03	0,49	1,42E+04	0,51	3,08E+03	0,48	5,75E+03
0,49	1,85E+04	0,50	5,37E+03	0,50	5,10E+03	0,73	2,02E+04	0,76	5,02E+03	0,97	1,22E+04
0,73	2,86E+04	0,76	8,62E+03	0,75	7,62E+03	1,46	3,92E+04	1,52	9,52E+03	1,45	1,76E+04
1,45	5,31E+04	1,51	1,66E+04	1,50	1,51E+04	2,92	7,91E+04	3,03	1,89E+04	2,90	3,33E+04
2,91	1,04E+05	3,02	3,25E+04	3,00	3,19E+04	6,08	1,66E+05	6,32	4,18E+04	5,81	6,50E+04
6,06	2,26E+05	6,30	6,35E+04	6,24	6,70E+04	12,16	3,71E+05	12,64	8,15E+04	12,10	1,43E+05
12,12	4,43E+05	12,60	1,35E+05	12,48	1,33E+05	24,32	7,09E+05	25,28	1,63E+05	24,20	2,82E+05
24,24	8,82E+05	25,20	2,68E+05	24,96	2,70E+05	36,48	1,06E+06	44,24	2,85E+05	48,40	5,46E+05
36,36	1,32E+06	37,80	3,98E+05	37,44	3,92E+05	42,56	1,24E+06	50,56	3,28E+05	72,60	8,15E+05
42,42	1,55E+06	44,10	4,65E+05	43,68	4,70E+05	48,64	1,42E+06			84,70	9,71E+05
		50,40	5,24E+05	49,92	5,22E+05	54,72	1,56E+06				
				56,16	5,99E+05						
				62,40	6,62E+05						

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. Datos calculados

Aceites														
AOX	Conc.	Med	SD (r)	Cv (r)	R	r%	SD (iR)	Cv (iR)	Rec	SD (Rec)	SD (Rec) Corrected	RSD (Rec) Corrected	u	U
PG	Alta	234,66	2,14	0,90	5,94	2,50	5,82	2,50	97,80	0,008	0,014	1,42	2,86	5,71
	Baja	14,38	0,14	1,00	0,39	2,70	0,36	2,50	99,90	0,008	0,008	0,85	2,63	5,27
TBHQ	Alta	239,06	2,64	1,10	7,31	3,10	8,32	3,50	99,60	0,011	0,011	1,13	3,66	7,32
	Baja	15,87	0,86	5,40	2,38	15,00	2,03	12,80	110,20	0,055	0,055	4,97	13,71	27,41
BHA	Alta	225,80	3,25	1,40	9,00	4,00	4,12	1,80	94,10	0,005	0,030	3,19	3,67	7,35
	Baja	13,02	0,31	2,30	0,85	6,50	0,80	6,10	90,40	0,017	0,051	5,61	8,30	16,59
OG	Alta	236,27	0,96	0,40	2,67	1,10	8,83	3,70	98,40	0,012	0,012	1,24	3,94	7,87
	Baja	13,51	0,42	3,10	1,16	8,60	1,49	11,00	93,80	0,041	0,041	4,41	11,87	23,74
BHT	Alta	217,10	3,91	1,80	10,85	5,00	10,50	4,80	90,50	0,015	0,050	5,53	7,34	14,69
	Baja	15,09	0,61	4,00	1,69	11,20	2,30	15,20	96,80	0,070	0,070	4,73	15,94	31,87
AP	Alta	447,41	6,52	1,50	18,07	4,00	21,66	4,80	93,20	0,015	0,037	3,97	6,26	12,52
	Baja	24,26	0,15	0,60	0,41	1,70	0,90	3,70	86,60	0,010	0,068	7,80	8,64	17,28
Grasas														
AOX	Conc.	Med	SD (r)	Cv (r)	r	r%	SD (iR)	Cv (iR)	Rec	SD (Rec)	SD (Rec) Corrected	RSD (Rec) Corrected	u	U
PG	Alta	254,35	4,60	1,80	12,75	5,00	17,45	6,90	106,00	0,029	0,029	2,75	7,39	14,78
	Baja	14,52	0,35	2,40	0,96	6,60	0,95	6,50	100,90	0,026	0,026	2,57	7,00	14,01
TBHQ	Alta	251,26	17,21	6,80	47,69	19,00	33,67	13,40	104,70	0,053	0,053	5,10	14,34	28,67
	Baja	14,55	0,78	5,30	2,15	14,80	1,52	10,40	101,00	0,040	0,040	3,97	11,16	22,33
BHA	Alta	243,80	4,91	2,00	13,60	5,60	10,68	4,40	101,60	0,017	0,017	1,69	4,70	9,39
	Baja	13,64	0,12	0,90	0,34	2,50	1,17	8,60	94,70	0,033	0,033	3,50	9,29	18,58
OG	Alta	251,22	2,54	1,00	7,04	2,80	6,91	2,80	104,70	0,011	0,026	2,48	3,70	7,41
	Baja	13,92	0,29	2,10	0,80	5,70	1,65	11,80	96,70	0,046	0,046	4,80	12,78	25,55
BHT	Alta	218,05	4,67	2,10	12,95	5,90	7,89	3,60	90,90	0,012	0,047	5,21	6,34	12,69
	Baja	13,67	0,37	2,70	1,03	7,60	0,46	3,40	94,90	0,011	0,027	2,89	4,44	8,89
AP	Alta	478,10	9,09	1,90	25,21	5,30	39,02	8,20	99,60	0,033	0,033	3,29	8,80	17,60
	Baja	26,58	0,67	2,50	1,86	7,00	1,09	4,10	94,90	0,014	0,029	3,06	5,11	10,22

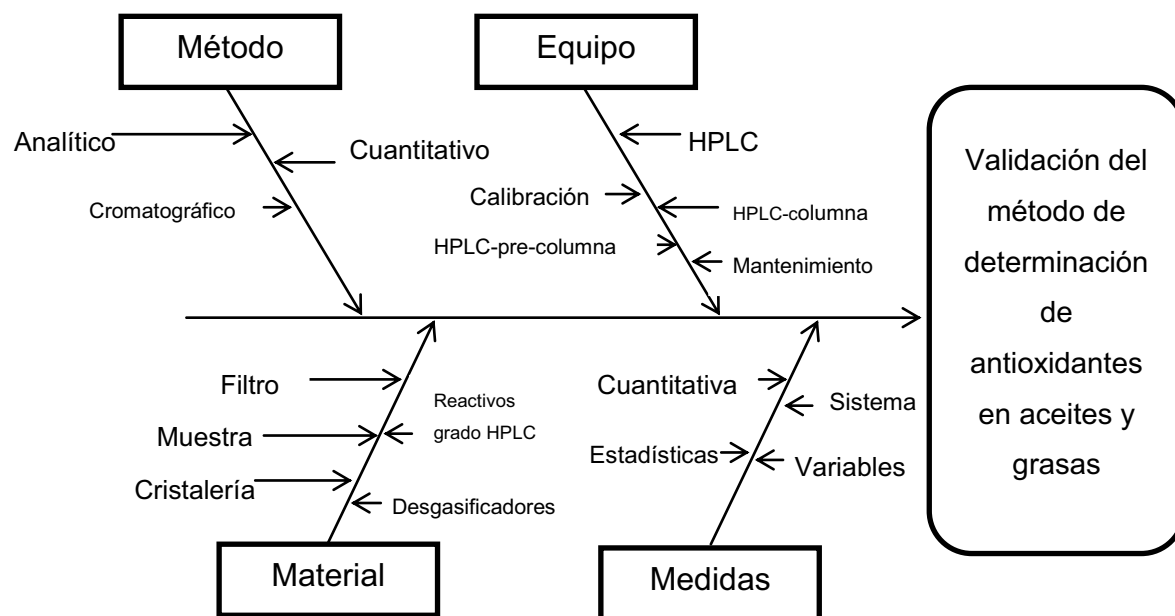
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Tabla de requisitos académicos**

Carrera	Campo de conocimiento	Área	Curso	Tema genérico	Tema específico
Ingeniería química	Ingeniería y tecnología	Química	Química 3	Concentración de soluciones	Tipos de concentraciones
			Química orgánica 1 y 2	Aceites y grasas	Reacciones de aceites y grasas
				Antioxidantes	Tipos de antioxidantes
			Análisis instrumental	Métodos analíticos	Métodos Instrumentales: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
				Tipos de detectores en cromatografía líquida	Detección ultravioleta en HPLC
		Operaciones unitarias	Transferencia de masa	Operaciones líquido-líquido	Separación por extracción líquido-líquido
		Ciencias básicas y complementarias	Matemática intermedia 1	Integración	Determinación de área bajo una curva
			Estadística 1	Estadística descriptiva	Elementos para establecer modelos matemáticos
			Estadística 2	Ensayos de hipótesis	Proceso de toma de decisiones
			Programación de computadoras	Software	Manejo adecuado del software

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma de antioxidantes fenólicos

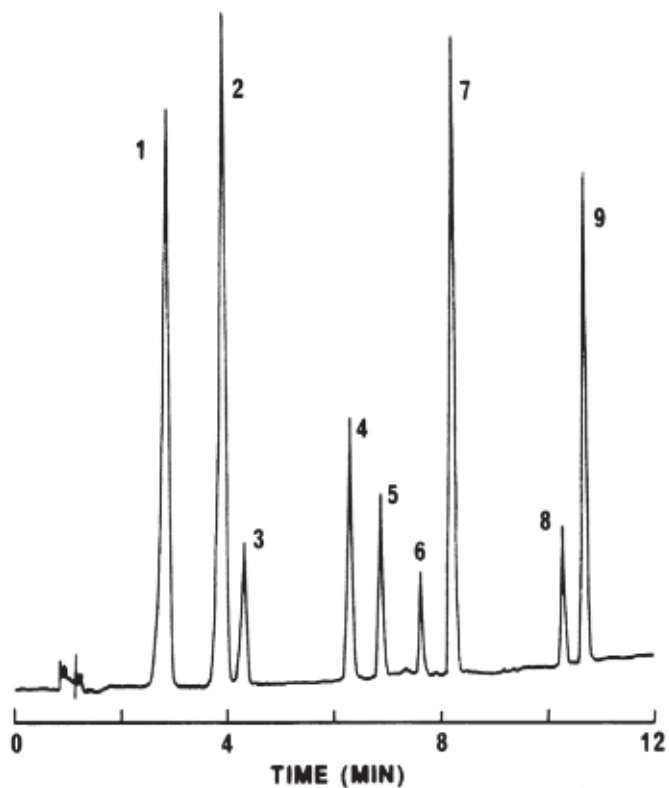


Figure 983.15. Chromatographic separation of antioxidant standards, ca 0.1 μ g each antioxidant: 1, PG; 2, THBP; 3, TBHQ; 4, NDGA; 5, BHA; 6, Ionox-100; 7, OG; 8, BHT; 9, DG.

Fuente: AOAC. Oficial Method 983.15: *Phenolic Antioxidants in oils, fats, and butter oil, Liquid Chromatographic Method*. p. 3

