



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA
LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA
(TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES**

Mirka Joselyn Téraj de la Cruz

Asesorado por el Ing. Ronal Adolfo Herrera Orozco

Guatemala, noviembre de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA
LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA
(TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

MIRKA JOSELYN TÉMAJ DE LA CRUZ

ASESORADO POR EL ING. RONAL ADOLFO HERRERA OROZCO

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Christian Moisés de la Cruz Leal
VOCAL V	Br. Kevin Vladimir Armando Cruz
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
EXAMINADOR	Ing. Carlos Salvador Wong Davi
EXAMINADOR	Ing. Victor Manuel Monzón Valdez
EXAMINADOR	Ing. Sergio Alejandro Recinos
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 DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA (TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 21 de agosto de 2017.



Mirka Joselyn Téraj de la Cruz

Guatemala, 31 de julio de 2019

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director de Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez Mejía.

Por este medio me permito informarle que he revisado el informe final de Trabajo de Graduación de EPS de **6 meses** de la estudiante **Mirka Joselyn Témaj de la Cruz** con No. Carné **201314163** y CUI **2630 68765 0101**, de la carrera de Ingeniería Química, titulado **VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA (TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES.**

Considero que el trabajo cumplió con los objetivos y requisitos propuestos, por lo que lo remito a su consideración para proseguir con los trámites correspondientes.

Atentamente,

RONAL ADOLFO HERRERA OROZCO
INGENIERO QUÍMICO
COL 201

Ing. Qco. Ronal Adolfo Herrera Orozco
Asesor de proyecto de EPS



Guatemala, 02 de julio de 2019.
Ref.EPS.D.228.07.19.

Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente

Estimado Ingeniero Álvarez Mejía.

Por este medio atentamente le envío el informe final correspondiente a la práctica del Ejercicio Profesional Supervisado, (E.P.S) titulado **"VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA (TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES"** que fue desarrollado por la estudiante universitaria Mirka Joselyn Témaj de la Cruz, quien fue debidamente asesorada y supervisada por el Ingeniero Sergio Alejandro Recinos.

Por lo que habiendo cumplido con los objetivos y requisitos de ley del referido trabajo y existiendo la aprobación del mismo por parte del Asesor - Supervisor de EPS, en mi calidad de Director apruebo su contenido solicitándole darle el trámite respectivo.

Sin otro particular, me es grato suscribirme.

Atentamente,

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Oscar Argueta Hernández
Director Unidad de EPS



/ra



Guatemala, 14 de febrero de 2020.
Ref. EIQ.TG-IF.008.2020.

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo 003-2018, le informo que reunidos los Miembros de la Tema nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL

Solicitado por el estudiante universitario: **Mirka Joselyn Téraj De La Cruz**.
Identificado con número de carné: **2630687650101**.
Identificado con registro académico: **201314163**.
Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química**.
En la modalidad: **Informe Final EPS (6 meses), Seminario de Investigación**.

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

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA (TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

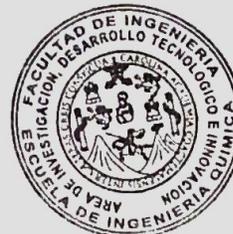
Ronal Adolfo Herrera Orozco, profesional de la Ingeniería Química

Habiendo encontrado el referido 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"

Ingrid Lorena Benitez Pacheco
Profesional de la Química
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo





Guatemala, 5 de noviembre de 2020.

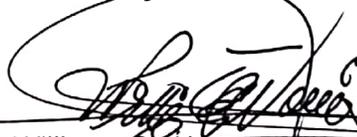
Ref. EIQ.294.2020

Aprobación del informe final del trabajo de graduación

Ingeniera
Aurelia Anabela Cordova Estrada
Decana
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala

Revisado el INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN (EJERCICIO PROFESIONAL SUPERVISADO), DENOMINADO **VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA (TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES** del(la) estudiante Mirka Joselyn Téraj de la Cruz, se conceptúa que el documento presentado, reúne todas las condiciones de calidad en materia administrativa y académica (rigor, pertinencia, secuencia y coherencia metodológica), por lo tanto, se procede a la autorización del mismo, para que el(la) estudiante pueda optar al título de Ingeniería Química.

“Id y Enseñad a Todos”


Ing. Williams S. Alvarez Mejia; M. Sc.
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Cc. Archivo
WGAM/mpea



ACAAI

Asociación de Instituciones de Administración de Empresas de Ingeniería y Arquitectura



Formando Ingenieros Químicos en Guatemala desde 1939



**NO SALGAS
QUÉDATE EN
CASA**

DTG. 381.2020.

La Decana 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 DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE TERBUTIL HIDROQUINONA (TBHQ) EN GRASAS Y ACEITES VEGETALES**, presentado por la estudiante universitaria: **Mirka Yoselyn Téraj de la Cruz**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Inga. Anabela Cordova Estrada
Decana

Guatemala, noviembre de 2020

AACE/asga

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por guiarme e inspirarme a través de todo el recorrido de mi vida y por darme la fuerza necesaria para alcanzar esta meta.
- Mi madre** Blanca Elizabeth de la Cruz por su infinito amor y su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y de mi carrera.
- Mi padre** Rubén Horlando Témej por ser mi ejemplo como profesional y por inspirarme siempre a ser mejor.
- Mi hermana** Lesly Pamela Témej porque sin su apoyo, sus ánimos y su energía, mi vida no sería la misma.
- Andrés Morales T.** Por acompañarme en este recorrido, por ser mi fortaleza e inspirarme para ser valiente y tomar decisiones fuera de mi zona de comodidad.

AGRADECIMIENTOS A:

Universidad de San Carlos de Guatemala	Por abrirme las puertas a todo el conocimiento que he adquirido para mi formación profesional.
Facultad de Ingeniería	Por brindarme las herramientas académicas y los conocimientos necesarios para cumplir mis metas profesionales.
Mis asesores	Ing. Ronal Herrera, Licda. Ingrid Benitez e Ing. Sergio Recinos, por guiarme y permitirme la realización de este proyecto.
Mis amigos de la Facultad	Por compartir conmigo este recorrido y sin cuya presencia esta meta hubiera sido más difícil de alcanzar
Mis amigas del colegio	Cuya amistad me ha inspirado a convertirme en un ejemplo de mujer empoderada para nuestro país y para el mundo.
Miguel Ángel Cardona	Por alegrarse conmigo cada vez que había un avance con el proyecto y por acompañarme por un postre cuando no.
Andrés Morales T.	Por el viaje a Colombia. ¡Gané!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTA DE SÍMBOLOS.....	IX
GLOSARIO.....	XI
RESUMEN	XVII
OBJETIVOS	XIX
HIPÓTESIS	XXI
INTRODUCCIÓN	XXIII
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Validación de métodos.....	5
2.1.1. Sensibilidad.....	6
2.1.2. Límite de detección.....	7
2.1.3. Precisión	7
2.1.3.1. Repetibilidad	7
2.1.3.2. Precisión intermedia.....	7
2.1.4. Linealidad y rango de trabajo.....	8
2.1.5. Exactitud	8
2.1.6. Límite de cuantificación.....	8
2.1.7. Robustez.....	8
2.2. Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación, OGA-GEC-016, para la selección y validación de métodos de ensayo	9
2.3. Selección de los métodos de ensayo.....	10

2.3.1.	Métodos normalizados.....	10
2.3.2.	Métodos no normalizados.....	11
2.4.	Aceites y grasas comestibles	11
2.4.1.	Clasificación de los aceites.....	11
2.4.1.1.	Aceite de palma aceitera	12
2.4.1.2.	Aceite de soya	13
2.4.1.3.	Aceite de palmiste.....	14
2.5.	Descripción de los procesos.....	14
2.5.1.	Refinado	14
2.5.2.	Blanqueado.....	16
2.5.3.	Desodorizado.....	16
2.6.	Propiedades fisicoquímicas	17
2.7.	Antioxidantes	17
2.7.1.	Tipos y estructuras de los antioxidantes.....	17
2.7.2.	Propiedades de los antioxidantes	18
2.7.3.	Regulaciones en cuanto al uso de antioxidantes.....	19
2.8.	Espectrofotometría	20
2.9.	Ley de Beer – Lambert	20
2.9.1.	Expresión de la Ley de Beer – Lambert.....	20
2.9.2.	Aplicación de la Ley de Beer – Lambert	22
3.	DISEÑO METODOLÓGICO	23
3.1.	Variables.....	23
3.1.1.	Variable de respuesta.....	24
3.2.	Localización.....	24
3.3.	Delimitación del campo de estudio	24
3.3.1.	Obtención de las muestras	25
3.4.	Diseño de tratamientos.....	26

3.5.	Recursos humanos	26
3.6.	Recursos materiales	27
3.6.1.	Materia prima	27
3.6.2.	Equipos auxiliares	27
3.6.3.	Instrumentos de medición	27
3.6.4.	Cristalería.....	28
3.6.5.	Software de medición y cálculos	28
3.6.6.	Reactivos	28
3.6.7.	Soluciones	28
3.7.	Técnica cualitativa o cuantitativa	28
3.8.	Recolección y ordenamiento de la información.....	29
3.9.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	46
3.10.	Análisis estadístico.....	51
3.10.1.	Media aritmética.....	51
3.10.2.	Desviación estándar.....	52
3.10.3.	Coefficiente de variación.....	52
4.	RESULTADOS	55
4.1.	Evaluación de linealidad y sensibilidad de la metodología mediante la caracterización de la absorbancia en función de la concentración de terbutil hidroquinona (TBHQ)	55
4.2.	Evaluación de precisión del método en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.....	56
4.3.	Evaluación de exactitud del método mediante ensayo de recuperación	58
4.4.	Establecimiento de límites de detección y cuantificación para la metodología espectrofotométrica.....	59

4.5.	Evaluación de robustez por medio de la variación de las condiciones de trabajo en el desarrollo de la metodología	60
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	65
	CONCLUSIONES	73
	RECOMENDACIONES	75
	BIBLIOGRAFÍA.....	77
	APÉNDICES	79
	ANEXOS	95

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Esquema resumen de las líneas de proceso de refinación química y física.....	15
2.	Estructura del terbutil hidroquinona (TBHQ).....	18
3.	Curva de calibración.....	31
4.	Extracción de TBHQ de grasas y aceites.....	33
5.	Determinación de concentración de TBHQ.....	34
6.	Evaluación de linealidad y sensibilidad.....	36
7.	Evaluación de repetibilidad de la metodología.....	37
8.	Evaluación de precisión intermedia.....	38
9.	Exactitud del método por ensayo de recuperación.....	39
10.	Determinación de límites de detección y cuantificación.....	41
11.	Evaluación de robustez variando tiempo de agitación.....	42
12.	Evaluación de robustez variando tiempo de reposo de separación de fases.....	43
13.	Evaluación de robustez variando tiempo de reposo de muestra con dimetilamina.....	44
14.	Evaluación de robustez variando volumen de extracto.....	45
15.	Curva de calibración para determinación de terbutil hidroquinona (TBHQ).....	55
16.	Relación unitaria entre la cantidad de terbutil hidroquinona de la muestra y la cantidad de TBHQ recuperada.....	59
17.	Comportamiento de absorbancia de muestras al variar tiempo de agitación de aceite o grasa vegetal con metanol.....	60

18.	Comportamiento de absorbancia de muestras al variar tiempo de reposo para separación de fase de extracto de metanol.....	61
19.	Comportamiento de absorbancia de muestras al variar tiempo de reposo de extracto de metanol con solución de dimetilamina (DMA).....	62
20.	Comportamiento de concentración de terbutil hidroquinona (TBHQ) al variar volumen de extracto de metanol utilizado en el análisis.....	63

TABLAS

I.	Descripción de variables	23
II.	Descripción de la recolección de muestras	25
III.	Formato de recolección de datos para la curva de calibración y parámetros de linealidad y sensibilidad.....	46
IV.	Formato de recolección de datos de absorbancias para determinación de exactitud.....	46
V.	Formato de recolección de datos de absorbancias para determinación de límites de detección y cuantificación.....	47
VI.	Formato de recolección de datos de absorbancias para análisis de repetibilidad.....	47
VII.	Formato de recolección de datos de absorbancias para análisis de precisión intermedia	48
VIII.	Formato de recolección de datos de absorbancia para evaluación de robustez variando tiempo de agitación.....	49
IX.	Formato de recolección de datos de absorbancia para evaluación de robustez variando tiempo de reposo para separación de fase extracto	49

X.	Formato de recolección de datos para evaluación de robustez variando tiempo de reposo de extracto con solución de dimetilamina..	50
XI.	Formato de recolección de datos para evaluación de robustez variando volumen de extracto de metanol para ensayo	50
XII.	Formato de recolección de datos de absorbancia para cada tipo de muestra.....	51
XIII.	Evaluación de linealidad y sensibilidad mediante curva de calibración del método.....	56
XIV.	Valores de repetibilidad por analista.....	56
XV.	Desviación estándar y coeficiente de variación promedio por analista.....	57
XVI.	Valores de precisión intermedia.....	57
XVII.	Criterios de aceptación para parámetro de exactitud	58
XVIII.	Exactitud del método por ensayo de recuperación	58
XIX.	Evaluación de recuperación mediante relación unitaria de Concentraciones de terbutil hidroquinona (TBHQ)	59
XX.	Parámetros de detección y cuantificación de la metodología	60
XXI.	Evaluación de robustez por variación de tiempo de agitación de aceite o grasa vegetal con metanol	61
XXII.	Evaluación de robustez por variación de tiempo de reposo para separación de fase de extracto de metanol	61
XXIII.	Evaluación de robustez por variación de tiempo de reposo de extracto de metanol con solución de dimetilamina	62
XXIV.	Evaluación de robustez por variación de volumen de extracto de metanol utilizado para análisis.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
A	Absorbancia
Cm	Centímetro
C	Concentración
R	Coefficiente de correlación de Pearson
R²	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de variación
%m/m	Concentración en porcentaje masa/masa
ρ	Densidad
g	Gramos
L_c	Límite de cuantificación
L_D	Límite de detección
L	Litros
λ	Longitud de onda
λ_{op}	Longitud de onda óptima
m	Masa de muestra de grasa o aceite
μg	Microgramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
M	Mol
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto

s	Segundos
V_{met}	Volumen de metanol
V_{ext}	Volumen de extracto de metanol
V_{DMA}	Volumen de dimetilamina

GLOSARIO

Absorbancia	Medida de la cantidad de luz que es absorbida por una sustancia. Se mide con un colorímetro o un espectrofotómetro.
Aceite de palma	Líquido graso de origen vegetal conseguido por medio del prensado del fruto en la palma aceitera. Este aceite puede ser procesado para obtener distintas fracciones, entre ellas oleína y estearina.
Aceite de palmiste	Líquido graso obtenido por el prensado mecánico de la nuez o semilla del fruto de la palma aceitera.
Aceite de soya	Líquido untuoso, ligero y amarillento obtenido por medio del prensado de la semilla de soya.
Ácidos insaturados	Se caracterizan por poseer dobles enlaces en su configuración molecular. Su punto de fusión es menor que el resto de las grasas por lo que físicamente se presentan de forma líquida como los aceites.
Ácidos saturados	Tipo de grasa que se caracteriza por la ausencia de enlaces dobles entre las cadenas de carbono que forman al ácido. Físicamente estos ácidos son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente como la margarina.

Analito	Componente o sustancia de una muestra cuya concentración es objeto de búsqueda en un análisis químico.
AU	Unidades de absorbancia.
BHA	El butilhidroxianisol es un sólido ceroso que exhibe propiedades antioxidantes. Producido a partir de 4-metoxifenol e isobutileno.
BHT	El butilhidroxitolueno es un agente antioxidante sintético utilizado en la industria alimentaria para prevenir la rancidez.
C_{LAB}	Concentración de antioxidante validada por laboratorio externo.
C_{TBHQ}	Concentración de terbutil hidroquinona.
CODEX	Código alimentario establecido por la FAO y organización Mundial de la Salud para elaborar normas alimentarias internacionales armonizadas, que protegen la salud de los consumidores y fomentan prácticas legales en el comercio de los alimentos.
Colorimetría	Medio que estudia la medida de los colores y que desarrolla métodos para la cuantificación del color, es decir la obtención de valores numéricos del color.

Dimetilamina	Gas incoloro que se almacena en 40 % a 45 % de concentración en agua. Afín con los fenoles.
Espectrofotometría	Medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda.
Estearina	Fracción sólida del aceite de palma utilizada en cantidades altas para producción de grasas vegetales.
FAO	Organización de alimentos y agricultura (FAO), que garantiza la seguridad alimentaria a la población.
FDA	Administración de alimentos y drogas (FDA), protege la salud pública mediante la regulación de medicamentos y productos biológicos de uso humano
Fenol	Compuesto orgánico cuya estructura molecular tiene un anillo aromático unido a un grupo funcional.
Fosfátido	Están constituidos por un polialcohol esterificado con ácidos grasos y ácido fosfórico. El ácido a su vez está combinado con un compuesto básico nitrogenado. Los más comunes son la lecitina y la cefalina.
Grasas	Término genérico para designar varias clases de sustancias lipídicas que funden entre 25 y 50°C,

obtenidas por el procesamiento de materias primas oleaginosas.

Índice de yodo	Es una medida que indica el número total de dobles enlaces presentes en grasas y aceites, con lo cual presenta el grado de insaturación del compuesto orgánico.
Longitud de onda	Distancia horizontal entre dos crestas o valles consecutivos de una onda.
Manteca	Sustancia grasa sólida a temperatura ambiente obtenida del fruto de algunas plantas.
Margarina	Sustancia grasa preparada por emulsión de agua y manteca, mezclada con otros ingredientes y aditivos.
OGA	Oficina Guatemalteca de Acreditación, su función principal es aplicar y administrar la acreditación en todo el territorio nacional, con el fin de reconocer la competencia técnica de los organismos en base a normas nacionales e internacionales vigentes.
Oleína	Fracción líquida del aceite de palma utilizada en cantidades altas para producción de aceites vegetales.
Palma aceitera	Planta monocotiledónea de origen inicial africano perteneciente a la familia de las Palmaceae.

Punto de nube	Temperatura a la cual, en condiciones controladas, se induce en la muestra una nubosidad causada por las primeras etapas de cristalización.
TBHQ	Terbutil hidroquinona es un polvo cristalino de blanco a bronceado, olor leve y soluble en agua. Utilizado como antioxidante o estabilizador químico.
Tocoferol	Compuesto orgánico antioxidante liposoluble ampliamente distribuido en la naturaleza.
UV-VIS	Ultravioleta – visible.

RESUMEN

Este informe presenta el diseño y la fundamentación para la validación técnica de una metodología espectrofotométrica alternativa de cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites vegetales; la metodología alternativa fue propuesta en el laboratorio fisicoquímico de una empresa industrial guatemalteca refinadora de grasas y aceites comestibles. El proyecto busca realizar la validación para establecer que la metodología es apta para la determinación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) y para establecer resultados confiables y cuantificables.

Para alcanzar los objetivos planteados en este informe se llevó a cabo la metodología propuesta, la cual consiste en la utilización de un espectrofotómetro para determinar la cantidad de antioxidante que contiene una muestra de grasa o aceite, haciendo reaccionar el antioxidante con dimetilamina (DMA). Con este método se buscaba construir una línea de relación absorbancia – concentración, utilizada para la realización del análisis espectrofotométrico de muestras de grasas y aceites que contienen antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) y medir el equivalente de color estándar de las soluciones patrón de terbutil hidroquinona en metanol (CH_4O).

Por otro lado, para la determinación de los parámetros de validación del método se realizó el procedimiento a un conjunto de 16 muestras de grasas y aceites (mantecas, margarinas y aceites) producidos dentro de la empresa refinadora. Estos con diferentes fracciones de oleína y estearina, así como también distintos tipos de aceites vegetales (aceite de palma, aceite de palmiste y aceite de soya). Se evaluó a cada uno los parámetros de linealidad,

selectividad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, robustez, límites de detección y cuantificación; ya que de esta manera podrá ser posible la validación de la metodología en base al documento otorgado por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA-GEC-016), el cual establece parámetros para ser aceptado por un proceso de acreditación.

Finalmente, cada uno de los parámetros evaluados determinó que la metodología permite obtener resultados confiables y cuantificables. Por lo que fue realizada su validación y su implementación en el laboratorio fisicoquímico de la refinería guatemalteca de grasas y aceites vegetales.

La validación de la metodología alternativa para cuantificación de terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites se llevó a cabo en las condiciones operatorias de temperatura y presión (20 °C y 0,89 atm) del laboratorio fisicoquímico de la empresa, debido a que los instrumentos analíticos adecuados para el desarrollo de esta técnica se encuentran en este laboratorio específico.

En el siguiente documento se encuentra toda la información obtenida en la experimentación.

OBJETIVOS

General

Validar una metodología espectrofotométrica para la cuantificación del antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites vegetales para el laboratorio fisicoquímico de una empresa refinadora de grasas y aceites en Guatemala, mediante la evaluación de los parámetros de rendimiento del método de acuerdo con la guía de validación de métodos OGA-GEC-016.

Específicos

1. Determinar la linealidad y sensibilidad de la metodología propuesta mediante la caracterización de una gráfica de absorbancia (AU) en función de su concentración (ppm) de terbutil hidroquinona (TBHQ).
2. Evaluar la precisión de la metodología, en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, utilizando muestras de distintos aceites y grasas comestibles producidos dentro de la empresa.
3. Comprobar la exactitud de la metodología a través del ensayo de recuperación para distintos aceites y grasas comestibles.
4. Establecer el límite de detección y el límite de cuantificación de la metodología espectrofotométrica propuesta.

5. Determinar la robustez de la metodología mediante la evaluación gráfica del comportamiento de los resultados al variar las condiciones de trabajo.

HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación (Hi)

Es posible realizar la implementación de una metodología alternativa para cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites mediante espectrofotómetro, para su utilización en industrias refinadoras de aceite de palma aceitera.

Hipótesis de investigación nula (Ho)

No es posible realizar la implementación de una metodología alternativa para cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites mediante espectrofotómetro, para su utilización en industrias refinadoras de aceite de palma aceitera.

INTRODUCCIÓN

La validación de las metodologías de ensayo dentro de un laboratorio es el proceso que establece parámetros de desempeño de la metodología para cumplir con requisitos particulares para un uso específico previsto de los resultados del ensayo, con el fin de que sean aceptados a nivel nacional, regional e internacional.

Por lo tanto, la validación forma parte importante para que un organismo satisfaga necesidades del cliente, garantizando que los métodos utilizados por el laboratorio sean apropiados para los ensayos o calibraciones que realiza.

Por ello, una validación de ensayo es clave para lograr la inocuidad de los productos y garantizar una alta calidad de los procesos productivos en una empresa refinadora de aceites y grasas vegetales. Las normas de calidad en laboratorios tienen como objetivo incrementar la competencia dentro de un laboratorio para mejorar la eficacia de sus ensayos o muestreos y así mismo aumentar la calidad de los productos.

La cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) es de suma importancia, ya que el uso del antioxidante en el producto posibilita extender su vida. Actualmente esta empresa productora de grasas y aceites cuenta con una metodología de determinación de TBHQ, la cual proporciona resultados netamente cualitativos pues se basa en el color desarrollado al hacer reaccionar dimetilamina (DMA) con una muestra de aceite o grasa vegetal que contiene antioxidante TBHQ.

La técnica colorimétrica mencionada anteriormente puede ser empleada en forma cuantitativa para determinar la cantidad exacta de antioxidante que posee cada producto, mediante la aplicación de técnicas analíticas, específicamente espectrofotometría.

Los resultados proporcionados por esta metodología alternativa serán más confiables debido a que su valor numérico indicará la concentración exacta de antioxidante y no será un criterio aproximado únicamente. Estos resultados conllevarán a incrementar la confianza en la calidad del producto producido.

En este proyecto de investigación se identificaron los parámetros por seguir según el reglamento de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA-GEC-016), los cuales son: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión intermedia, repetibilidad y sensibilidad; para cumplir con el objetivo del proyecto detallado anteriormente.

1. ANTECEDENTES

Los estudios realizados sobre la evolución del complejo oleaginoso han demostrado que es uno de los más dinámicos a partir de los años setenta, siendo también importante generador de exportaciones. En contraste con la evolución de la producción industrial global del país, la industria aceitera experimentó una notable expansión durante los últimos quince años.

El notable aumento en la producción de granos oleaginosos en el país ha sido una condición importante para que una empresa agroindustrial guatemalteca con 40 años de experiencia y liderazgo en refinación de grasas y aceites vegetales de alta calidad sea apta para atender al mercado local.

Esta corporación posee una planta de 100 toneladas métricas diarias de refinación y actualmente compite en el mercado mundial de grasas y aceites. La integración de la empresa desde las plantaciones de palma aceitera hasta el producto ya terminado ha llevado a esta compañía a diversificar sus líneas de productos y los exhorta a exportar a otros países de Centroamérica y el Caribe.

La empresa refinadora de grasas y aceites vegetales cuenta con varios departamentos, en los cuales participan ejecutivos de mercadeo, desarrollo de nuevos productos, gestión y aseguramiento de calidad, venta, logística, planificación y producción. Dichos departamentos han trabajado conjuntamente por la innovación constante de sus productos y empaques o envases que se adapten a las demandas progresivas del mercado.

Para esto la compañía cuenta con las instalaciones, equipos necesarios y laboratorios que permiten llevar a cabo las pruebas específicas para cumplir con los estándares de calidad, logrando así que los productos sean lanzados exitosamente.

En la ingeniería química se lleva a cabo el desarrollo de diversos análisis y métodos para la determinación de compuestos presentes o productos a nivel comercial e industrial. Algunos de estos son las grasas y aceites vegetales. Durante los años de producción se han desarrollado metodologías certificadas para la cuantificación de antioxidantes en los productos oleaginosos por su valor en la producción de aceites o grasas vegetales y alargar su tiempo de vida.

La Sociedad Americana de Químicos de Aceite (AOCS, por sus siglas en inglés), proporciona la norma Ce 6-86, la cual cubre una metodología para la determinación de distintos antioxidantes en grasas y aceites utilizados en industria alimenticia; procedimiento el cual hace uso de cromatografía líquida para su cuantificación.

La metodología utilizada en la compañía actualmente para determinar antioxidantes cualitativamente se rige por un método desarrollado por estudiantes de la Universidad del Valle de Guatemala dentro de la empresa. El cual consiste en utilizar dimetilamina (DMA) como indicador de fenoles del antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ); por medio de la intensidad de la coloración se determina, a partir de patrones estándar, la cantidad aproximada o presencia de dicho antioxidante.

Por otro lado, la metodología anteriormente mencionada puede mejorarse al utilizar espectrofotometría ultra violeta-visible para detectar la cantidad exacta de antioxidante en la muestra de aceite o grasa vegetal. Como referencia a la

metodología por validar, se toma el método de “Estimación de terbutil hidroquinona (TBHQ)”.¹

Cabe mencionar que para este estudio se analiza la cuantificación de terbutil hidroquinona (TBHQ) debido a que este antioxidante es el de mayor estabilidad en grasas y aceites por encima del 3-terbutil hidroxianisol (BHA) y el diterbutilhidroxitolueno (BHT).

Para que el método mencionado sea considerado apto para su aplicación, se realizan ciertos procedimientos para medir su eficacia, a esto se le llama “Validación de métodos” y se basa en el procedimiento de la guía OGA-GEC-016.

La Oficina Guatemalteca de Acreditación, OGA, desarrolla la guía “Política de Selección y Validación de Métodos” en 2007. En esta se plantea una guía, con el fin de que todo método seleccionado debe haber sido validado como parte de su desarrollo.

Conjuntamente, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño en base a las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su confirmación como método apto para el fin previsto. Demostrando de esta manera que el laboratorio usuario domina el método y lo usa correctamente.

Las referencias mencionadas anteriormente ayudan a comprender mejor los criterios por tomar en cuenta en el proyecto ya que sirven como base para la

¹ RANGANNA, S. *Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*. p. 318

nueva validación o validaciones que se lleven a cabo en un futuro dentro de la empresa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Validación de métodos

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser aceptados.

Se podría decir que la validación del método consiste en definir un requisito y confirmar que el método de ensayo evaluado tiene capacidades de desempeño consistes con lo que la aplicación requiere.

Todos los métodos nuevos que se introduzcan en un laboratorio deben estar además documentados, y todos los analistas que los vayan a utilizar han de recibir una formación adecuada y demostrar su competencia en su utilización antes de empezar a actuar en casos concretos.

También necesitan una reválida, o al menos una verificación, los métodos comercializados. Los procedimientos recomendados por los fabricantes han de respetarse lo máximo posible. En caso contrario, si se introducen cambios importantes, se necesitará una validación completa. Si un método se modifica o se aplica en una situación nueva se necesitará una revalidación o una verificación, según el alcance de la modificación y el carácter de la nueva situación.

Los métodos por validar pueden ser clasificados en diferentes formas, pero para fines útiles de esta investigación se clasificarán como métodos cualitativos y cuantitativos.

La validación o la verificación de un método, ya sea cualitativo o cuantitativo, se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, entre otras.

Los métodos cuantitativos de análisis exigen, para su validación, que se determine principalmente la siguiente serie de parámetros que han de cumplirse:

- Sensibilidad
- Límite de detección
- Precisión
- Linealidad y rango de trabajo
- Exactitud
- Límite de cuantificación
- Robustez

2.1.1. Sensibilidad

Representa la menor concentración detectable o medible. A partir de esta es posible determinar los límites de detección y cuantificación, influyendo en la capacidad de determinar cualitativa y cuantitativamente el analito y diferenciar los resultados positivos y negativos.

Determina la capacidad de la prueba de detectar el analito en la muestra que se está analizando.

2.1.2. Límite de detección

Es la concentración mínima de analito que puede ser detectada con un determinado grado de incertidumbre. Es entonces la concentración mínima que puede ser distinguida del ruido de fondo. Para estimar el límite de detección pueden utilizarse métodos que dependan del análisis de especímenes en blanco.

2.1.3. Precisión

Mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método.

Las condiciones en que se mide la precisión se dividen en: repetibles, condiciones reproducibles o de precisión intermedia. Para esta investigación se definirá únicamente por fines útiles la repetibilidad y precisión intermedia.

2.1.3.1. Repetibilidad

Esta condición existe cuando el mismo analista analiza idénticos objetos el mismo día, con el mismo método y con los mismos instrumentos, por ejemplo: espectrofotómetro UV-visible, o los mismos materiales y en el mismo laboratorio de la empresa.

2.1.3.2. Precisión intermedia

Esta es la medida de la precisión de los resultados que se realiza utilizando el mismo método a idénticos objetos de análisis, en el mismo laboratorio, pero con diferente analista.

2.1.4. Linealidad y rango de trabajo

Se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz.

Se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación (R) elevado. El coeficiente de correlación es el que indica el grado de relación entre la variable de concentración X y la variable Y de la curva de calibración.

2.1.5. Exactitud

Es la medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos.

2.1.6. Límite de cuantificación

Se refiere a determinar la menor concentración en la que un analito en la muestra puede ser determinada con la exactitud y precisión requeridas para el método en particular. Este valor puede ser la menor concentración en la curva del patrón.

2.1.7. Robustez

Es la determinación de la capacidad del método para no verse afectado por pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo. Esto se logra al considerar

todas aquellas condiciones que, durante el desarrollo del método, se observó que pueden afectar los resultados.

Este parámetro proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal, optimiza el método analítico, para describir en qué condiciones analíticas se pueden obtener resultados confiables.

Entre las condiciones analíticas que pueden afectar un método se pueden mencionar: reactivos, tiempo de reacción, temperatura, analista, cantidad de analito de muestra, estabilidad de la muestra, entre otras.

2.2. Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación, OGA-GEC-016, para la selección y validación de métodos de ensayo

Los métodos de ensayo seleccionados sean estos normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio, deben estar adecuadamente validados y documentados, previo a su uso. Actualmente no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto de la validación de métodos de ensayo.

El propósito del documento es definir una política para la selección y validación de métodos de ensayo por ser aplicada por la OGA en la evaluación de los laboratorios que le soliciten su acreditación, en evaluaciones de seguimiento y reevaluaciones.

El reconocimiento formal de la competencia técnica de los laboratorios de ensayo es uno de los principales objetivos de la OGA, con el fin de que los resultados que estos organismos emitan sean aceptados a nivel nacional, regional e internacional.

2.3. Selección de los métodos de ensayo

Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados para el propósito, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio.

El laboratorio, de común acuerdo con el cliente, puede seleccionar los métodos utilizando su criterio propio o utilizar aquellos métodos normalizados vigentes en el país. En caso de usar un método normalizado, se debe demostrar que este es la última edición, a menos que sea apropiado o posible el uso de una versión anterior del método.

Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe establecer un sistema para evaluar la factibilidad de implementar los posibles cambios introducidos en las nuevas versiones del método, determinando las diferencias en cuanto a equipo, formación del personal, instalaciones y demás aspectos necesarios para la ejecución del ensayo.

2.3.1. Métodos normalizados

Estos son métodos analíticos desarrollados por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico al que corresponde.

“Las normas de calidad y regulaciones frecuentemente requieren el uso de métodos normalizados. A la vez, el uso de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que el método será ampliamente utilizado; sin embargo, algunas veces el laboratorio puede contar con un método propio más adecuado

para el propósito. Los métodos normalizados deben ser utilizados por el laboratorio exactamente como están descritos”.²

2.3.2. Métodos no normalizados

Estos métodos analíticos son aquellos desarrollados por un tercero o un método que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método que se encuentra ya normalizado.

2.4. Aceites y grasas comestibles

Aceite es un término utilizado para designar numerosos líquidos grasos de orígenes diversos que no se disuelven en el agua y que tienen menos densidad que esta. Los aceites comestibles provienen tanto del reino animal como vegetal. Los aceites y grasas vegetales comestibles son indispensables para mantener el equilibrio de los lípidos, colesterol y lipoproteínas que circulan en la sangre, tienen la capacidad de resaltar muchas de las características sensoriales de los alimentos, como el sabor, el aroma y la textura.

Una persona debe consumir entre un 20 % y 30 % de las calorías totales como grasas por día. Esto es, para un adulto que necesita 2 000 kilocalorías por jornada, se requieren entre 44 y 76 gramos de grasas y aceites. En el caso de un niño, se necesitan entre 26 y 40 gramos.

2.4.1. Clasificación de los aceites

Pueden distinguirse dos tipos de aceite, los vírgenes y los refinados. El aceite virgen es extraído mediante prensado en frío conservando el sabor de la

² OGA. OGA-GEC-016 *Política de selección y validación de métodos de ensayo*. Guatemala. p.3

fruta o semilla de la que son extraídos. Los principales aceites vírgenes son los de oliva y girasol, algunos de semillas como alazor, colza, soja, pepitas de uva, de calabaza o de algunos frutos secos como la nuez, almendra y avellana.

Los aceites refinados son aquellos que se someten a un proceso de refinado y desodorizado que permite obtener un aceite que responde a ciertos criterios. Organolépticamente es de un sabor neutro, visualmente está limpio y con un color adecuado, además es seguro alimentariamente y permite una mejor conservación. Esta técnica se utiliza para modificar aceites que no son aptos para el consumo humano y para aumentar la producción de determinados productos que, si fuesen sometidos a presión en frío para obtener un aceite virgen, no resultarían rentables económicamente.

Entre los aceites obtenidos por este proceso de refinación se pueden mencionar los aceites de girasol, maíz, soya, aguacate y palma.

2.4.1.1. Aceite de palma aceitera

El aceite de palma es una grasa vegetal que se obtiene a partir de los frutos y las semillas de la palma Guinea o palma de aceite. Esta palmera, *Elaeis Guineensis*, pertenece a la familia palmáceas. Es una planta de hasta 20 m de altura cuyo tronco termina en una corona de hojas pinnadas. Su área de distribución natural es la zona tropical del oeste de África, pero se ha aclimatado en la región suroccidente y norte de Guatemala con condiciones físicas similares. Precisa suelos fértiles y estaciones lluviosas que produzcan inundaciones. La importancia económica radica en sus frutos. Son frutas con hueso en las que, tanto el pericarpio del fruto, como la semilla, son oleaginosos.

El aceite de palma se obtiene normalmente por la decantación del pericarpio hervido en agua, aunque hay métodos industriales que facilitan la obtención del aceite también de la semilla. Es un aceite muy parecido al de coco. Su punto de fusión elevado indica un contenido alto de ácidos grasos saturados.

A nivel industrial se efectúa un proceso de fraccionamiento del aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado (palma RBD); del cual se obtienen dos fracciones, una líquida denominada oleína y otra sólida denominada estearina. La oleína se produce en proporción más abundante y es el éster del ácido oleico (trioleiato de glicerina), mientras que la estearina es el éster del ácido esteárico (triestearato de glicerina).

El aceite obtenido de la palma africana tiene cuatro ácidos grasos. Dos de ellos son insaturados (ácido oleico y linoleico), constituyen el 49 % del aceite y son líquidos a temperatura ambiente. Los otros dos, palmítico y esteárico constituyen el 51 %, son ácidos grasos saturados y sólidos a temperatura ambiente.

2.4.1.2. Aceite de soya

La soya es una leguminosa que está presente en la cadena alimenticia hace más de 2 000 años. Ha sido un producto básico en la dieta asiática y con el tiempo se introdujo la soya en la dieta del resto del mundo.

El mismo se procesa por medio de limpieza, acondicionado, descascarado y laminado. Seguido de ello se extrae el aceite de soya de las hojuelas, estas se secan obteniendo hojuelas de soya desgrasadas las cuales son utilizadas para harinas o proteína a base de soya. Por otro lado, el aceite extraído es de color amarillento y abundante en ácidos grasos poliinsaturados como omega 3 y omega 6.

2.4.1.3. Aceite de palmiste

El aceite de palmiste es extraído de la semilla del fruto de la palma aceitera. Es un aceite muy estable, denominado como láurico por su alto contenido de este ácido graso, tiene un alto índice de saponificación, por lo que es muy utilizado en la industria química, principalmente para la elaboración de jabones y cremas. Representa entre un 3 a 6 % del peso fresco del racimo y es extraído mecánicamente por el prensado de la semilla o por medio de solventes como el hexano.

2.5. Descripción de los procesos

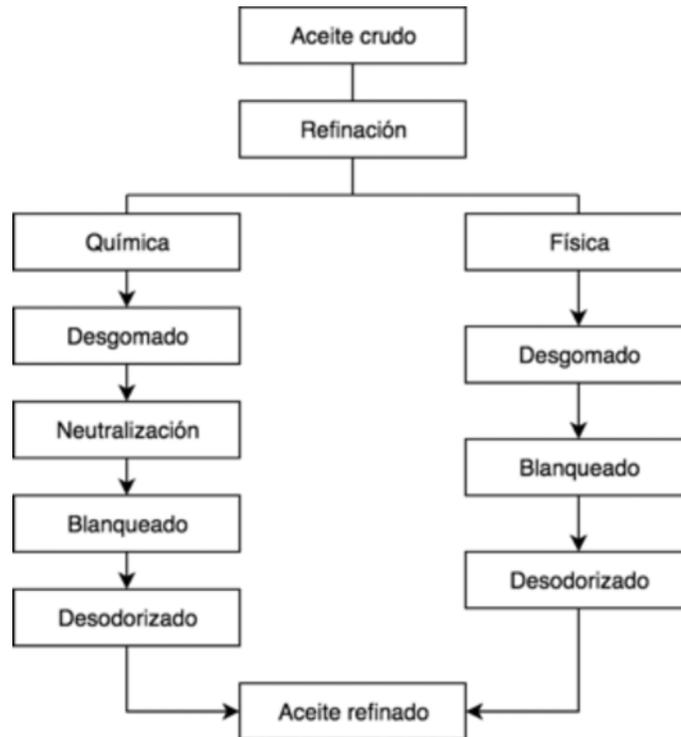
Para llevar a cabo la producción de aceites vegetales se necesita de un conjunto de procesos industriales, los cuales se detallan como sigue:

2.5.1. Refinado

La refinación de aceites comestibles tiene por objeto la eliminación de los compuestos indeseables presentes en los aceites crudos, ya sea por su toxicidad, porque comunican características de color, olor y sabor no agradables al consumidor, o porque afectan a la estabilidad del producto.

Existen dos métodos de refinación de aceites: refinación química y refinación física. En la primera de ellas, todos los ácidos junto con otras impurezas son eliminados durante la etapa de neutralización mediante una disolución alcalina. Por su parte, la refinación física se caracteriza por la ausencia de tal etapa, por lo que los ácidos grasos libres son eliminados mediante un proceso de destilación. Por ello, la refinación física solo requiere tres etapas, mientras que la refinación química puede necesitar más de seis.

Figura 1. **Esquema resumen de las líneas de proceso de refinación química y física**



Fuente: BLANCO, Pilar. *Diseño de una planta piloto de refinación de aceites vegetales*. p.25

La refinación física no siempre puede ser aplicable a cualquier tipo de aceite. La elección final entre un modo de refinación u otro depende principalmente del contenido de impurezas y al contenido de ácidos grasos libres. En el caso del aceite crudo de soya, comúnmente es refinado químicamente, ya que este posee un alto porcentaje de fosfátidos que lo hacen impropio para la refinación física.

Por otro lado, el aceite de palma por su bajo contenido de impurezas y su alto grado de ácidos grasos libres es refinado físicamente.

2.5.2. Blanqueado

Consiste en reducir los niveles de sustancias perjudiciales para la estabilidad del aceite, como pigmentos, productos derivados de la oxidación, gomas, humedad, metales como hierro o cobre, y sólidos en suspensión.

Las gomas se acondicionan mezclándolas con una solución de ácido cítrico. Las materias colorantes e impurezas se remueven mezclando el aceite con tierra de blanqueo en un tanque con sistema de agitación y calefacción mínima de 95 °C, eliminando la presencia de aire por medio de vacío. La tierra se separa del aceite por filtración en un filtro hermético de hojas, a través de cuyas hojas el aceite es filtrado y la tierra queda atrapada en la parte externa.

2.5.3. Desodorizado

La desodorización es la última etapa de refinación y se caracteriza por brindar el aceite de alta calidad. El objeto es la eliminación de los componentes más volátiles en su mayoría aldehídos y cetonas, incluyendo ácidos grasos libres, glicerol, productos de oxidación, esteroides, beta carotenos y otros, mediante arrastre de vapor a altas temperaturas y vacío absoluto.

El proceso consiste en precalentar el aceite blanqueado con aceite ya desodorizado en un intercambiador de calor. El aceite precalentado continúa en calentamiento con bajo vacío hasta la temperatura requerida para cumplir con las condiciones de destilación de los ácidos grasos. En seguida, el aceite calentado fluye hacia el desodorizador.

Dentro del desodorizador, el aceite permanece la cantidad de tiempo necesaria para eliminar los olores y sabores indeseables, también para reducir el contenido de ácidos grasos hasta el nivel que se requiere.

2.6. Propiedades fisicoquímicas

Para producir grasas y aceites industriales de buena calidad es necesario cumplir con ciertos parámetros físicos y químicos. Entre algunos de estos parámetros se pueden encontrar:

- Color
- Peróxido
- Acidez
- Punto de fusión
- Punto de nube
- Índice de yodo
- Impurezas
- Concentración de antioxidantes
- Porcentaje de sólidos
- Ácidos saturados
- Ácidos insaturados

2.7. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos químicos que protegen al aceite contra los efectos devastadores de las reacciones de oxidación. La mayoría de antioxidantes para grasas y aceites se pueden clasificar por su origen natural o sintético.

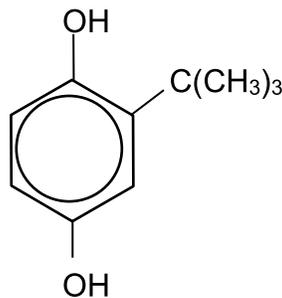
2.7.1. Tipos y estructuras de los antioxidantes

Los antioxidantes tienen como principios de acción el secuestro de radicales libres, secuestro de oxígeno e inactivación de peróxidos. Así mismo, deben ser

inodoros, e incoloros. Algunos de los antioxidantes más utilizados son: terbutil hidroquinona (TBHQ), 3-terbutil hidroxianisol (BHA), diterbutilhidroxitolueno (BHT) los cuales son productos químicos sintéticos y los tocoferoles de origen natural.

El terbutil hidroquinona (TBHQ) es un polvo de color blanco, que exhibe un destacado efecto estabilizador en las grasas insaturadas, en especial de los aceites vegetales poli-insaturados. Posee una adecuada solubilidad en grasa y aceites; y se puede mezclar con otros antioxidantes como el BHA para producir fórmulas antioxidantes más eficaces.

Figura 2. **Estructura del terbutil hidroquinona (TBHQ)**



Fuente: PATTERSON, H. *Bleaching and Purifying Fats and Oils*. p. 105.

2.7.2. **Propiedades de los antioxidantes**

Las principales propiedades de los antioxidantes en aceites y grasas son:

- Solubilidad: son solubles en aceite para poder homogenizar correctamente dentro del mismo y no precipitar. Aquellos que son hidrófilos como el galato de propilo y en menor grado como el terbutil hidroquinona (TBHQ) son adecuados para sistemas con muy poca agua, como los aceites y grasas puras.

- Volatilidad y estabilidad térmica: deben poseer buena estabilidad térmica puesto que las grasas y aceites son normalmente utilizados en procesos de alta temperatura. Por ello no deben deteriorarse ante la acción del calor ni deben tener alta volatilidad para que no escapen del aceite y este pierda la protección brindada por el antioxidante. Los tocoferoles y el TBHQ poseen mayor estabilidad térmica que el BHA y BHT, los cuales inician su volatilización a 180 °C.
- Potencial de hidrógeno: en general los antioxidantes fenólicos tienen más carácter ácido que básico, por lo que son compatibles con productos con pH menor de 7. Algunos, como el galato de propilo, tienden a inactivarse en condiciones alcalinas como en las mantecas usadas para panadería, que son de naturaleza alcalina; para ello funcionan mejor el TBHQ, BHA y BHT.

2.7.3. Regulaciones en cuanto al uso de antioxidantes

La reglamentación de la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos y las normas alimentarias internacionales del *Codex Alimentarius* permiten la utilización de TBHQ, o combinaciones de TBHQ con BHA, o BHT, o ambos, para consumo humano en concentraciones de hasta 200 ppm adicionados a una grasa o aceite.

Las formulaciones compuestas basándose en TBHQ, BHA y BHT imparten menor estabilidad que una formulación a base únicamente de TBHQ. Esto significa que las mezclas de antioxidantes pueden ser empleadas para productos que no requieren de mucho tiempo de almacenamiento, lo cual hace que el antioxidante TBHQ sea el más adecuado para alimentos de procesamiento industrial.

2.8. Espectrofotometría

Se denomina espectrofotometría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda. La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía.

El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Puesto que el color presentado se encuentra en el rango colorimétrico entre 600 y 650 nm (color amarillo a naranja), se puede suponer que su mayor absorción se dará en el rango cercano al UV, entre 400 y 500 nm, pues un objeto absorbe con mayor intensidad en el rango de su color complementario, en este caso el azul y el violeta.

2.9. Ley de Beer – Lambert

En óptica, la ley de Beer-Lambert, también conocida como ley de Beer o ley de Beer-Lambert-Bouguer es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.

2.9.1. Expresión de la Ley de Beer – Lambert

La ley de Beer-Lambert relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la intensidad saliente después de que en dicho medio se produzca absorción.

La relación entre ambas intensidades puede expresarse a través de las siguientes relaciones:

- Para líquidos

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-\varepsilon b C}$$

Donde:

I_t = la intensidad de luz saliente o transmitida por la muestra, cd

I_0 = la intensidad de luz incidente sobre la muestra o que proviene de la fuente, cd

ε = el coeficiente de absortividad molar, $M^{-1}cm^{-1}$

b = la longitud de la trayectoria del haz de luz que atraviesa la muestra o el espesor de la celda, cm

C = concentración del absorbente en el medio, M

La relación I_t/I_0 se conoce como transmitancia T , y es la medida primaria que se realiza en los instrumentos para medir la absorción de luz por parte de una muestra.

La luz absorbida sería $I_0 - I_t$, es decir la diferencia entre la intensidad de la luz incidente y la intensidad transmitida después de pasar a través de la muestra. Cuando se toma el logaritmo decimal negativo de la relación I_t/I_0 , entonces:

$$-\log \frac{I_t}{I_0} = -\log T$$

Esta relación representa la cantidad de luz absorbida por la muestra, que recibe el nombre de absorbancia (A). La ley de Beer-Lambert-Bouguer se puede entonces escribir de las siguientes formas:

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-\varepsilon bc} \equiv -\log T = \varepsilon bc \equiv A = \varepsilon bC$$

La ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa.

2.9.2. Aplicación de la Ley de Beer – Lambert

La aplicación práctica de la Ley de Beer es, que conociendo la absorbancia de una sustancia podemos averiguar su concentración y esto se puede lograr mediante una curva de calibración.

La curva de calibración es la representación gráfica en un eje de coordenadas de la absorbancia (eje de ordenadas) frente a la concentración (eje de abscisas). Se ensayan varias soluciones de concentración conocida y se determinan sus A, construyéndose la curva de calibrado, que es una recta. Una vez ensayadas las soluciones problemas, su concentración se averigua por interpolación de las A de las soluciones problema en la curva de calibración.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

Las variables manipuladas y trabajadas durante la experimentación fueron las siguientes:

Tabla I. Descripción de variables

Parámetros	Unidades	Constante	Variable	Controlable	No controlable	Dependiente	Independiente
Masa de muestra de aceite o grasa vegetal	G		X	X			X
Concentración de solución de color estándar	mg/L		X	X			X
Absorbancia	N/A		X		X	X	
Concentración de antioxidante TBHQ	ppm		X		X	X	
Tiempo de agitación de muestra de aceite y metanol	min	X		X			X
Concentración de solución de dimetilamina	%v/v	X		X			X
Volumen de solución de dimetilamina	mL	X		X			X
Volumen de extracto de metanol	mL		X	X			X
Volumen de metanol total utilizado	mL	X		X			X

Fuente: elaboración propia.

3.1.1. Variable de respuesta

Las variables de respuesta son los valores obtenidos de los parámetros de rendimiento para la validación del método.

- Sensibilidad
- Linealidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Exactitud
- Precisión intermedia
- Repetibilidad
- Robustez

3.2. Localización

La fase experimental de la investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio fisicoquímico en el departamento de aseguramiento de calidad de una empresa refinadora de aceites y grasas vegetales de Guatemala.

3.3. Delimitación del campo de estudio

Se llevó a cabo la validación de una metodología espectrofotométrica para la cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites vegetales a nivel laboratorio de análisis fisicoquímico.

- Fundamento del conocimiento: química analítica, química orgánica de aceites y grasas, espectrofotometría.

- Aplicación de procedimiento experimental: espectrofotometría, análisis estadístico.
- Ubicación: área de espectrofotometría del laboratorio fisicoquímico en el departamento de aseguramiento de calidad de una empresa refinadora de aceites y grasas vegetales.
- Equipo: espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS

3.3.1. Obtención de las muestras

Se realizó un total de 16 muestreos pertenecientes a diferentes tipos de aceites o grasas vegetales producidos en la compañía guatemalteca. Las muestras pueden desplegarse de la siguiente manera:

Tabla II. Descripción de la recolección de muestras

Producto por evaluar	Cantidad de muestras total	Tipo de producto	Sub cantidad
Aceite	9	Oleína de palma – soya	2
		Palma	1
		Soya	3
		Oleína de palma	1
		Oleína de palma - palma	2
Manteca	6	Palma	4
		Palma - soya	1
		Palmiste	1
Margarina	1	Palma	1

Fuente: elaboración propia.

3.4. Diseño de tratamientos

Se llevó a cabo un análisis de 16 muestras totales a distintos aceites y grasas vegetal producidos dentro de la empresa. Cada una de dichas muestras fue evaluada una cantidad de 3 veces, lo cual dará un total de tratamientos de 48.

3.5. Recursos humanos

Investigador:	Mirka Joselyn Téraj de la Cruz
Asesor:	Ing. Qco. Ronal Herrera
Analistas de laboratorio de aseguramiento de calidad:	Analista 1 Analista 2 Analista 3

El personal de laboratorio involucrado en el desarrollo del método y el investigador, fueron entrenados por parte del proveedor del espectrofotómetro Genesys 10S; entrenamiento con el cual el personal pudo cumplir con los requerimientos del equipo y estuvo capacitado para realizar las mediciones necesarias. Este entrenamiento se respaldó con un certificado.

Por otro lado, el investigador se encargó de capacitar al personal de laboratorio con respecto al desarrollo de la metodología, indicando asimismo recomendaciones y acciones correctivas por aplicar en caso de obtener resultados desviados.

3.6. Recursos materiales

Los recursos materiales con los que se trabajó en el laboratorio fisicoquímico para realizar la investigación fueron los siguientes:

3.6.1. Materia prima

- Aceite de palma aceitera
- Aceite de soya
- Manteca de palma
- Manteca de palmiste
- Margarina de palma

3.6.2. Equipos auxiliares

- Plancha de calentamiento IKA C-MAG HS 10
- Campana de extracción
- Agitador magnético

3.6.3. Instrumentos de medición

- Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS (Anexo 1)
- Balanza electrónica Swiss Made ES 320A
- Pipetas volumétricas Tipo A de 5 mL
- Pipetas volumétricas Tipo A de 10 mL
- Balones aforados Tipo A de 100 mL
- Bureta digital Titrette Brand Tipo A de 50 mL
- Micropipetadores

3.6.4. Cristalería

- Tubos de ensayo de 30 mL
- Celdas espectrofotométricas de 10 mm
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón

3.6.5. Software de medición y cálculos

- Microsoft Excel Versión 2013
- Minitab Versión 17.2.1

3.6.6. Reactivos

- Dimetilamina (DMA) al 40 % en solución con agua (H₂O)
- Metanol grado espectro, químico orgánico.
- N-Butanol

3.6.7. Soluciones

- Solución estándar de terbutil hidroquinona (TBHQ) en metanol, a distintas concentraciones.
- Solución de dimetilamina (DMA) al 25 % en agua.

3.7. Técnica cualitativa o cuantitativa

El método alternativo de determinación de antioxidante en grasas y aceites vegetales mediante la implementación de una técnica espectrofotométrica presenta resultados de carácter cuantitativo. El fin de esta es proporcionar resultados cuantificables que pueden ser más fácilmente manejables y

comparables con la metodología cualitativa que actualmente se utiliza en el laboratorio.

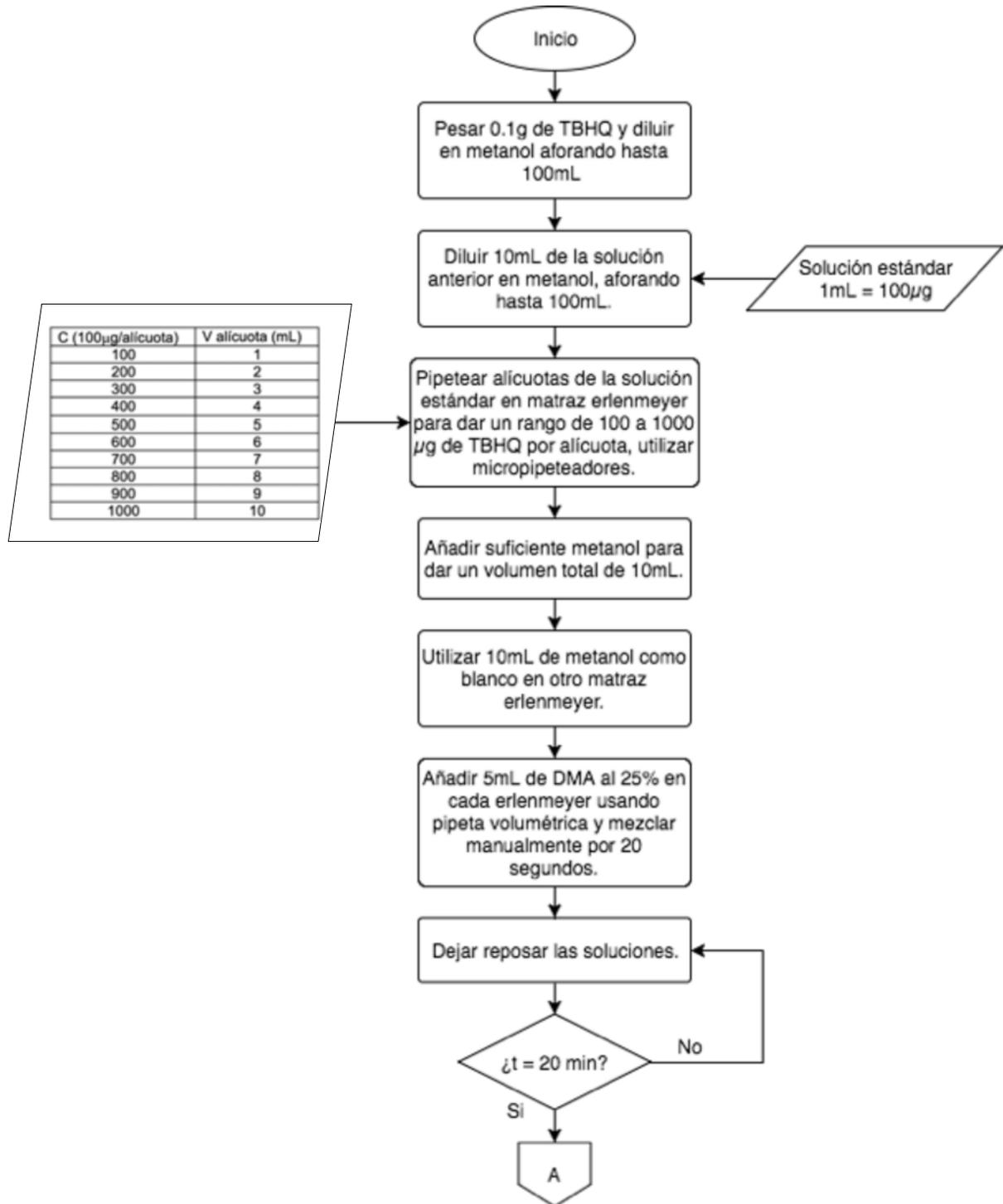
3.8. Recolección y ordenamiento de la información

Para la recolección de la información necesaria se propusieron los siguientes procedimientos:

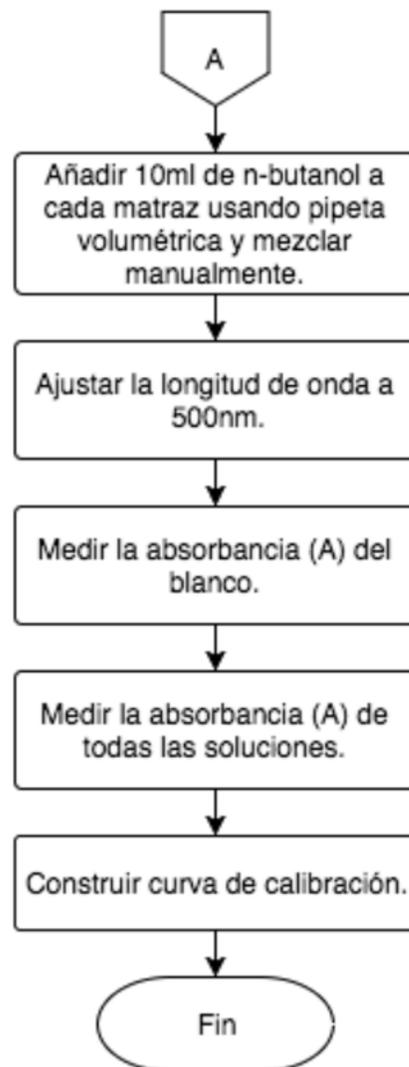
- Realizar una curva de calibración con soluciones de terbutil hidroquinona (TBHQ) en metanol.
- Llevar a cabo la extracción de terbutil hidroquinona de las grasas y aceites seleccionados.
- Determinar la concentración de antioxidante en la grasa o aceite, evaluando la absorbancia del extracto con dimetilamina y n-butanol, utilizando el espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS.
- Determinar los parámetros de validación utilizando los siguientes procedimientos:
 - Comprobar la linealidad y sensibilidad de la metodología evaluando la curva de calibración y el coeficiente de correlación de Pearson (R) y el coeficiente de determinación (R^2).
 - Evaluar la repetibilidad de la metodología efectuando una serie de análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, entre otros) en un mismo laboratorio y en un tiempo corto.

- Evaluar la precisión intermedia del método efectuando una serie de análisis sobre las muestras con algunas condiciones operativas distintas. (Diferentes analistas, distintos días de trabajo, mismos aparatos y reactivos) en un mismo laboratorio y en un tiempo más prolongado.
- Comprobar la exactitud de la metodología mediante el ensayo de recuperación, comparando resultados del método con relación a valores conocidos o verificados.
- Determinar los límites de detección y cuantificación, realizando un análisis de la desviación estándar y la media al valor del blanco.
- Verificar la robustez para determinar la significancia de ciertas variables para interferir con las medidas de antioxidante en cada muestra, realizando variaciones de tiempo de agitación, tiempos de reposo y volumen de extracto de metanol utilizado.

Figura 3. Curva de calibración

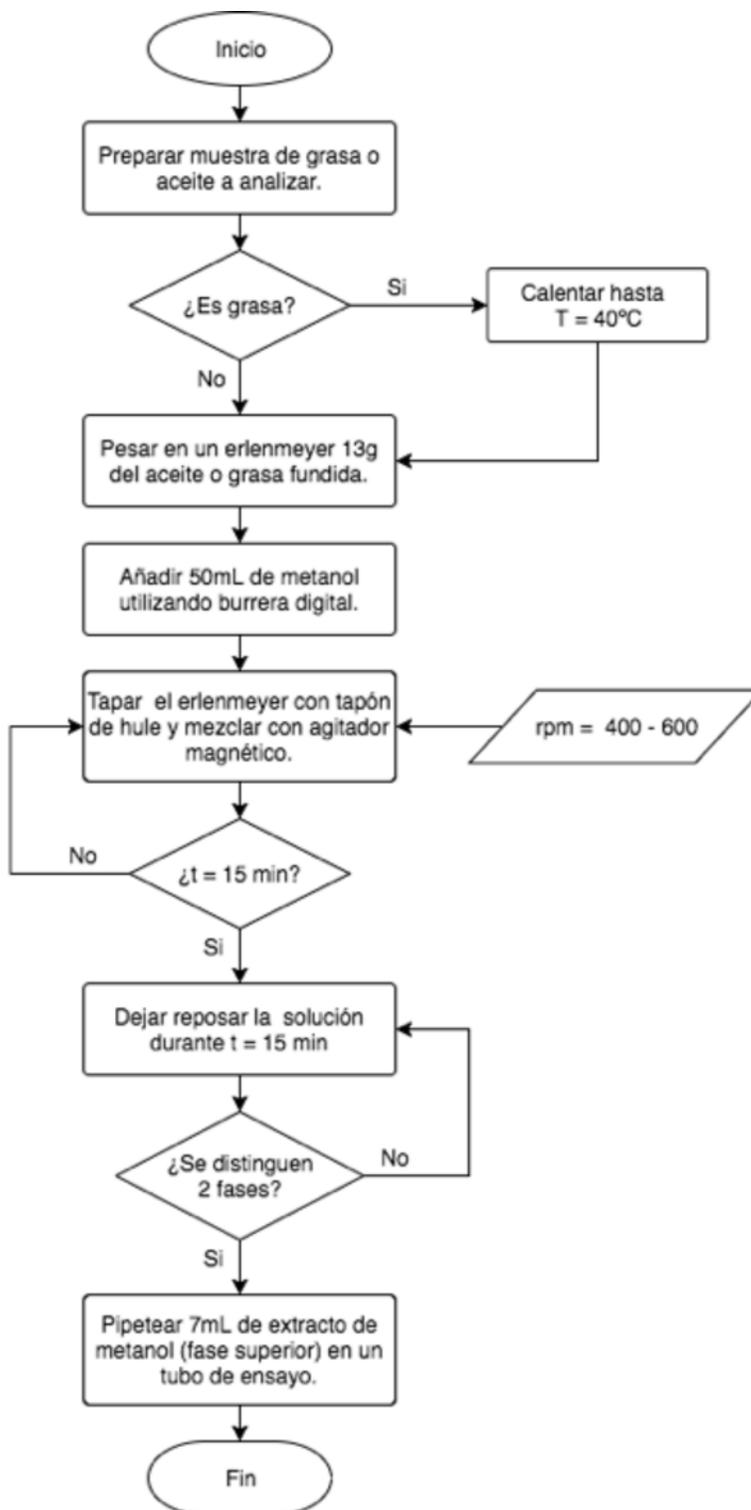


Continuación de la figura 3.



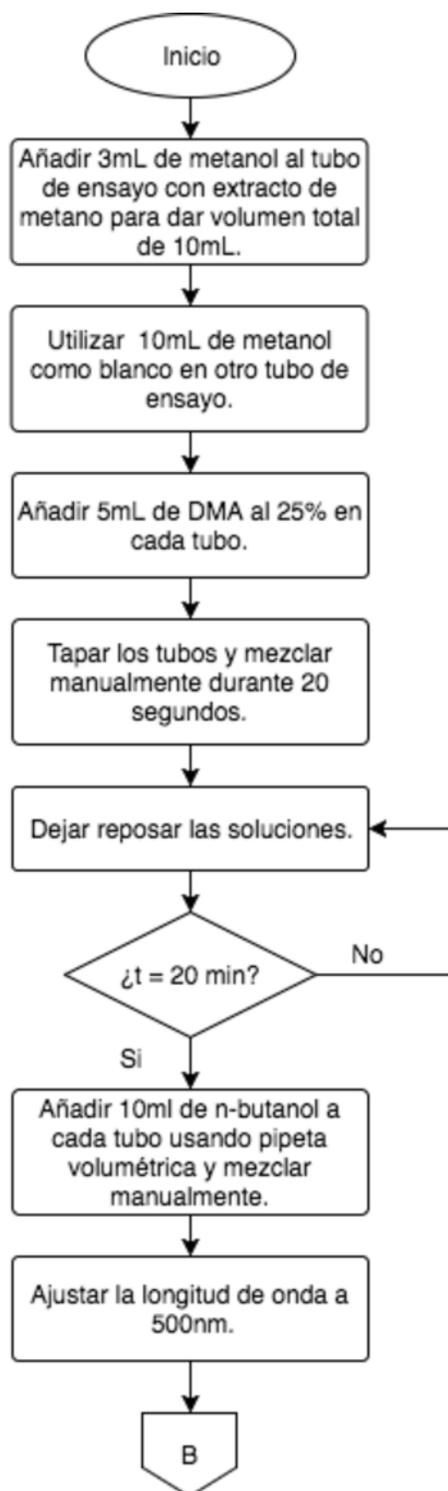
Fuente. elaboración propia.

Figura 4. Extracción de TBHQ de grasas y aceites

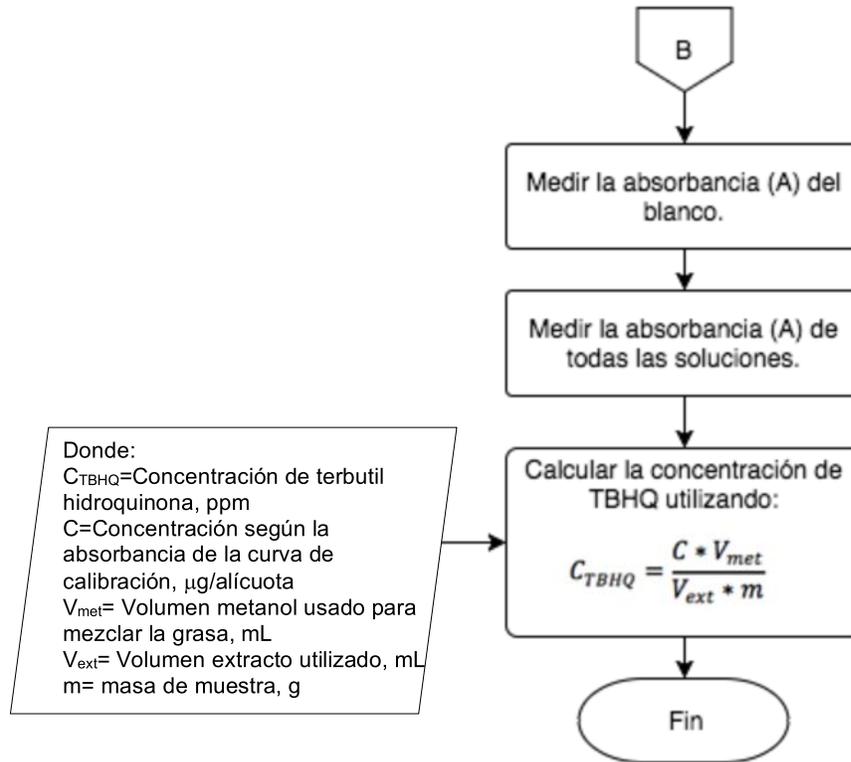


Fuente: elaboración propia.

Figura 5. **Determinación de concentración de TBHQ**



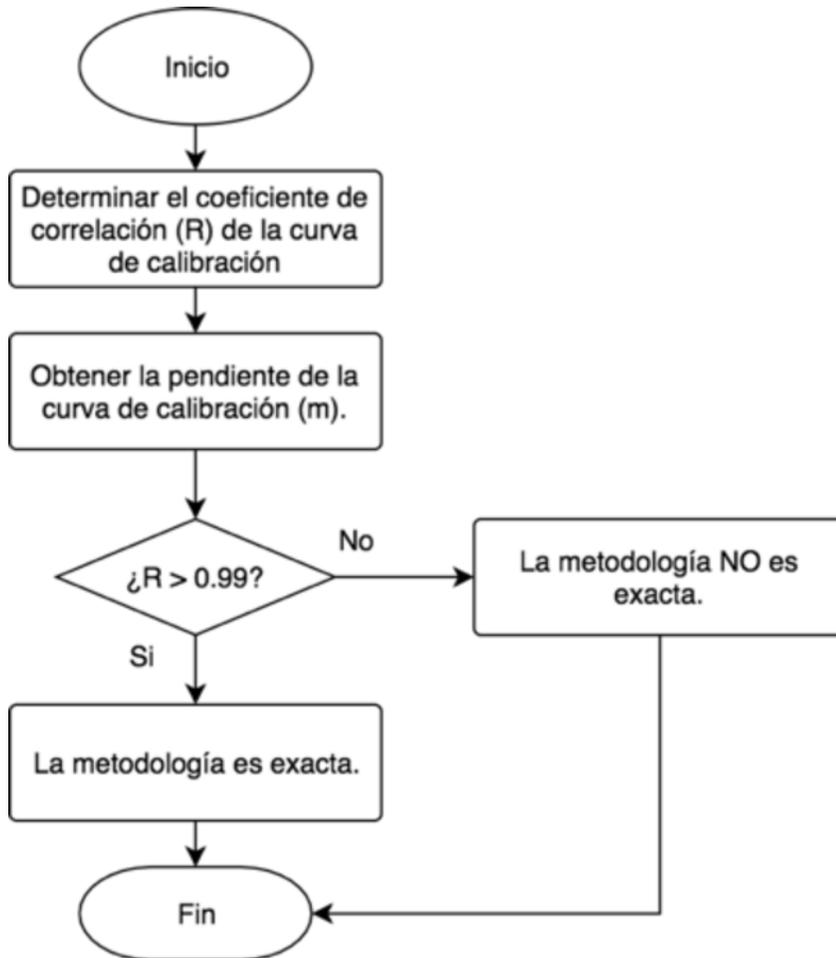
Continuación figura 5.



Fuente: elaboración propia.

El procedimiento de la figura 2 y 3 se efectuó a 16 muestras de grasas y aceites distintos, producidos en la empresa industrial del país.

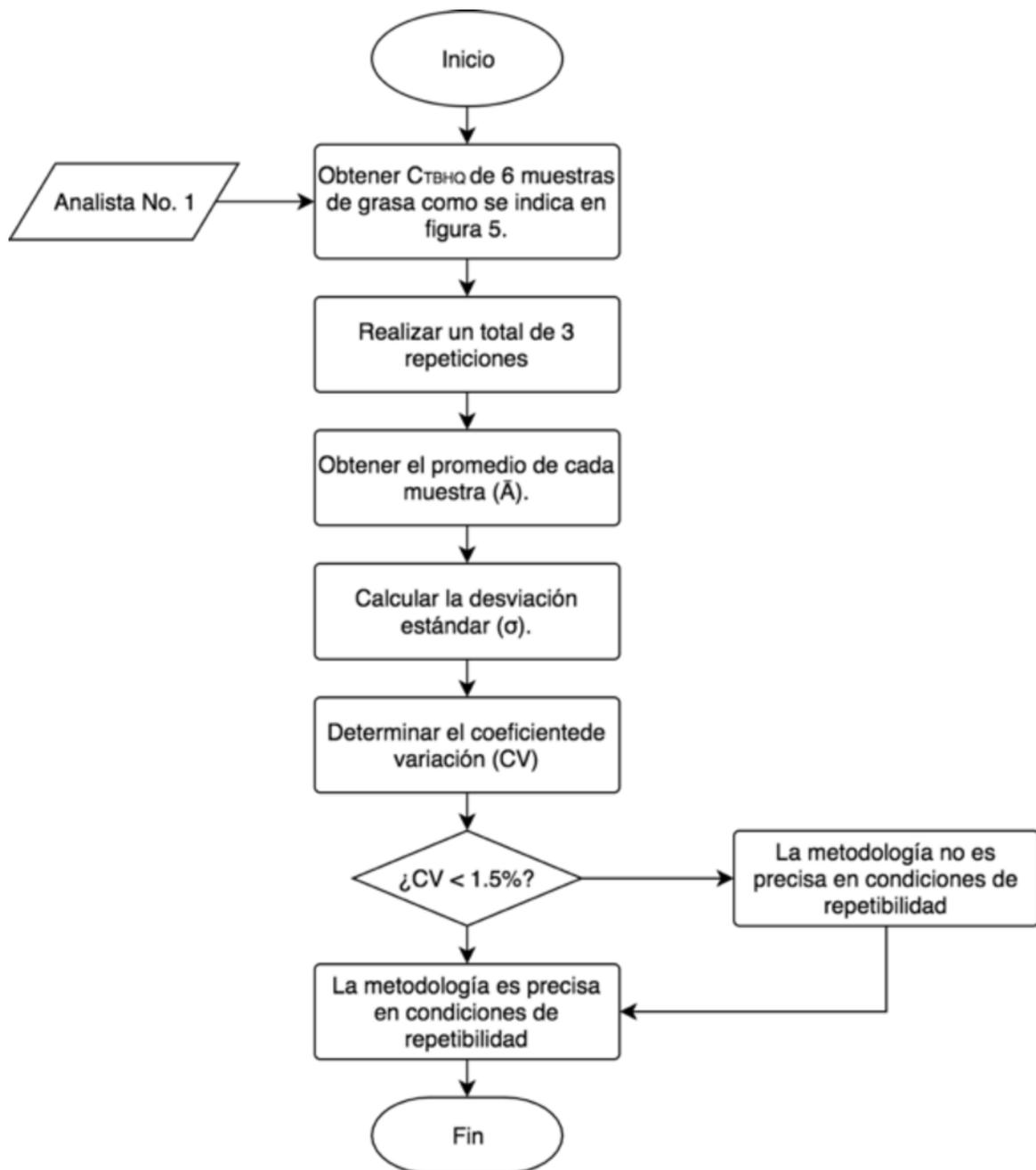
Figura 6. Evaluación de linealidad y sensibilidad



Fuente: elaboración propia.

La sensibilidad del método se determinó por medio de la pendiente (m) de la curva de calibración.

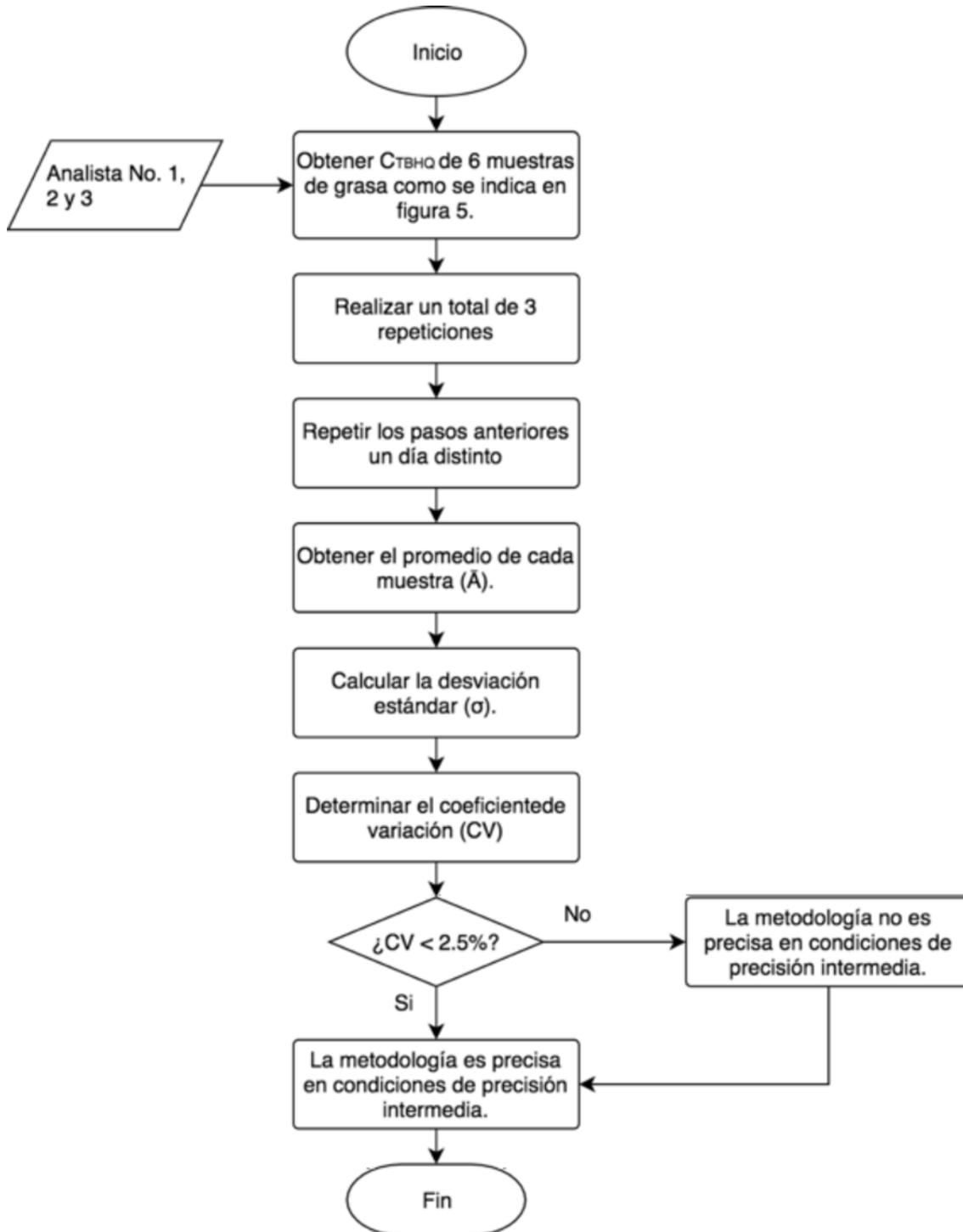
Figura 7. Evaluación de repetibilidad de la metodología



Fuente: elaboración propia.

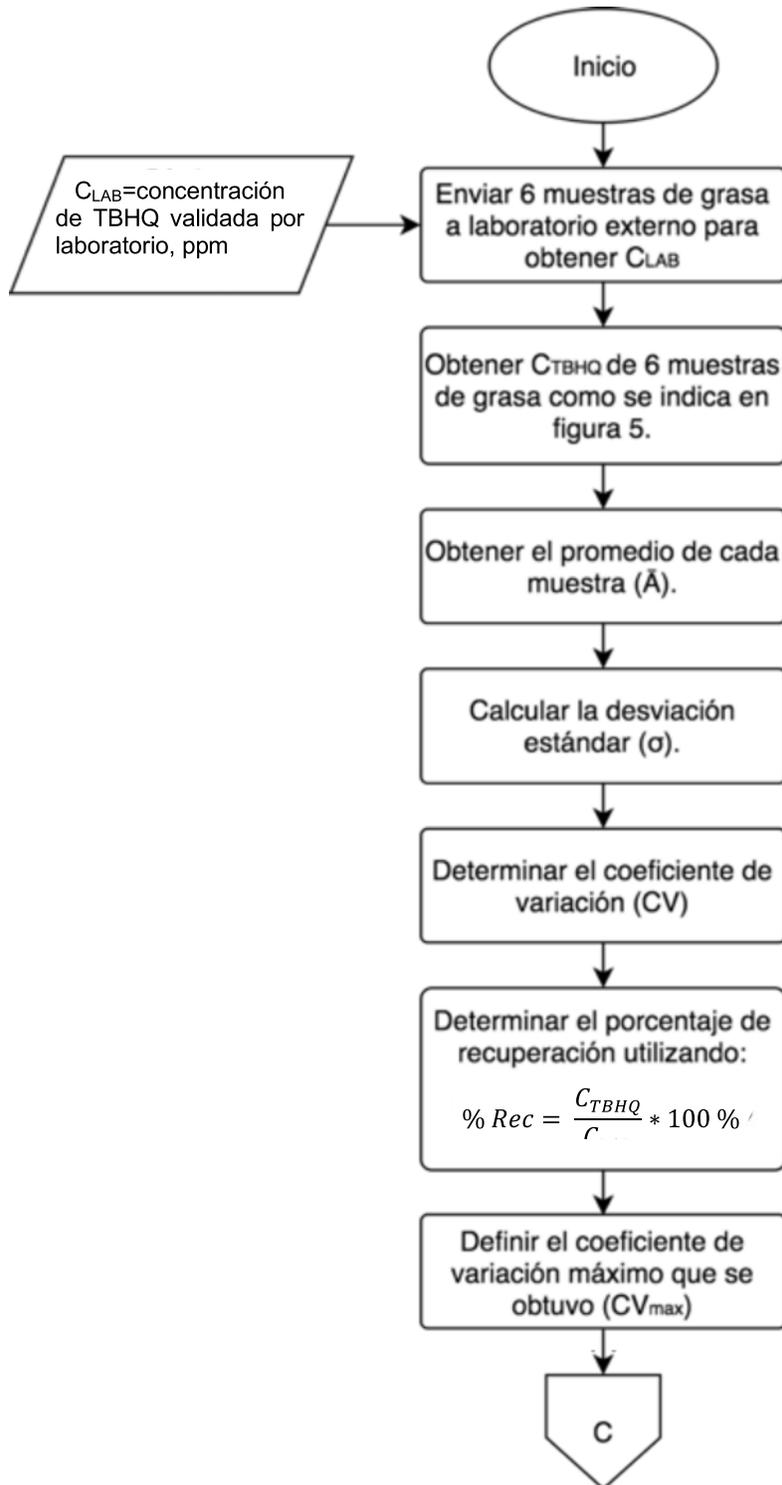
La repetibilidad se evaluó también a los analistas No. 2 y 3.

Figura 8. Evaluación de precisión intermedia

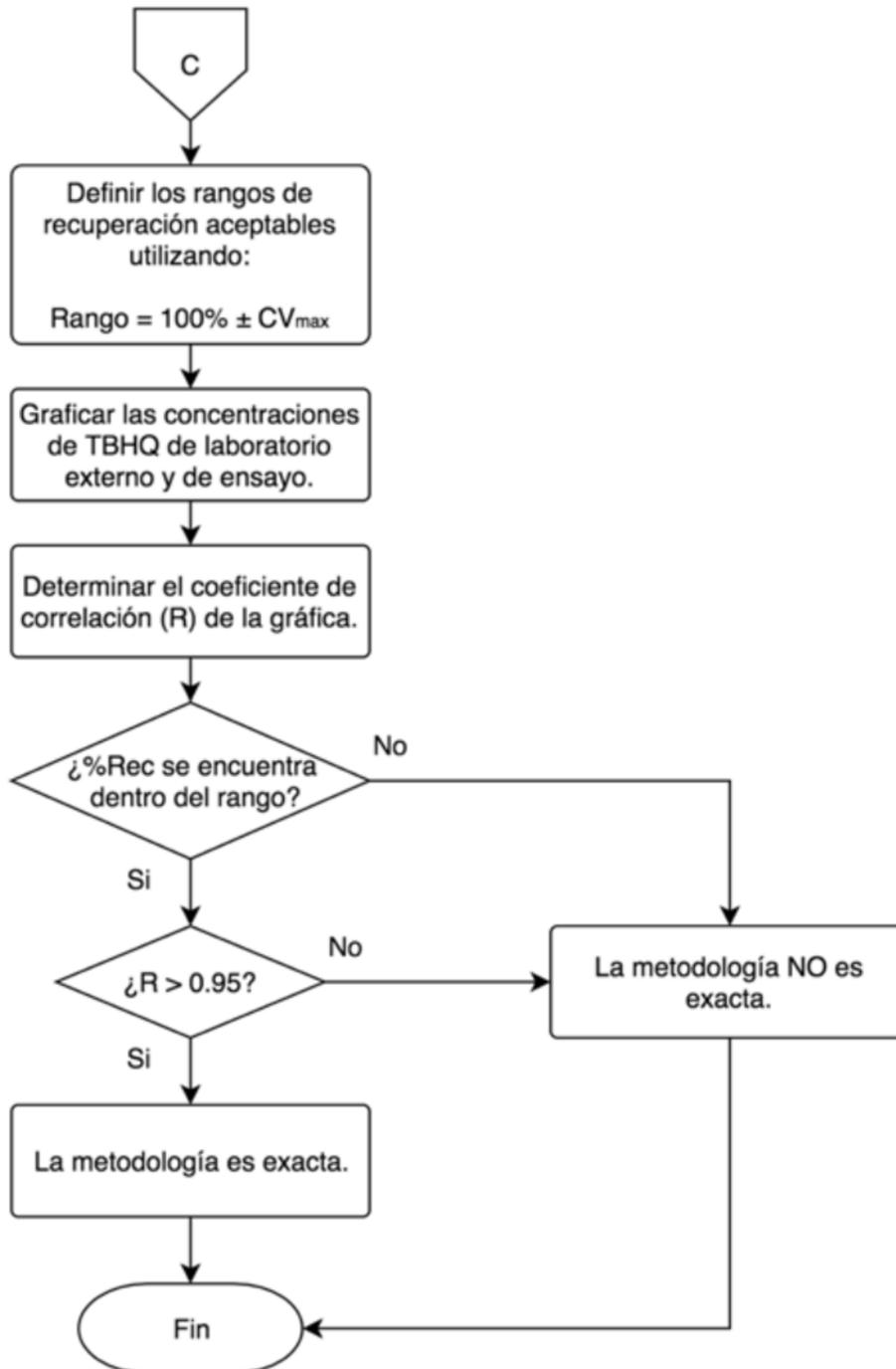


Fuente: elaboración propia.

Figura 9. Exactitud del método por ensayo de recuperación

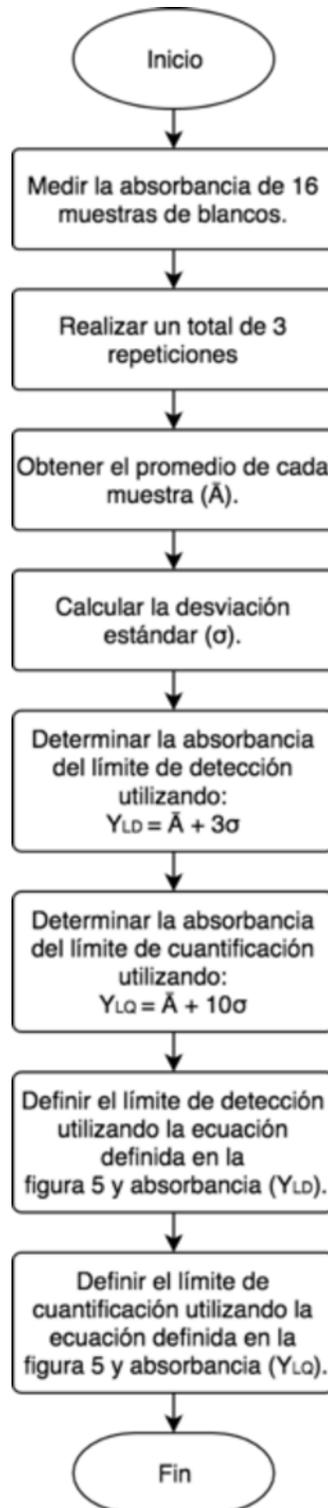


Continuación de figura 9.



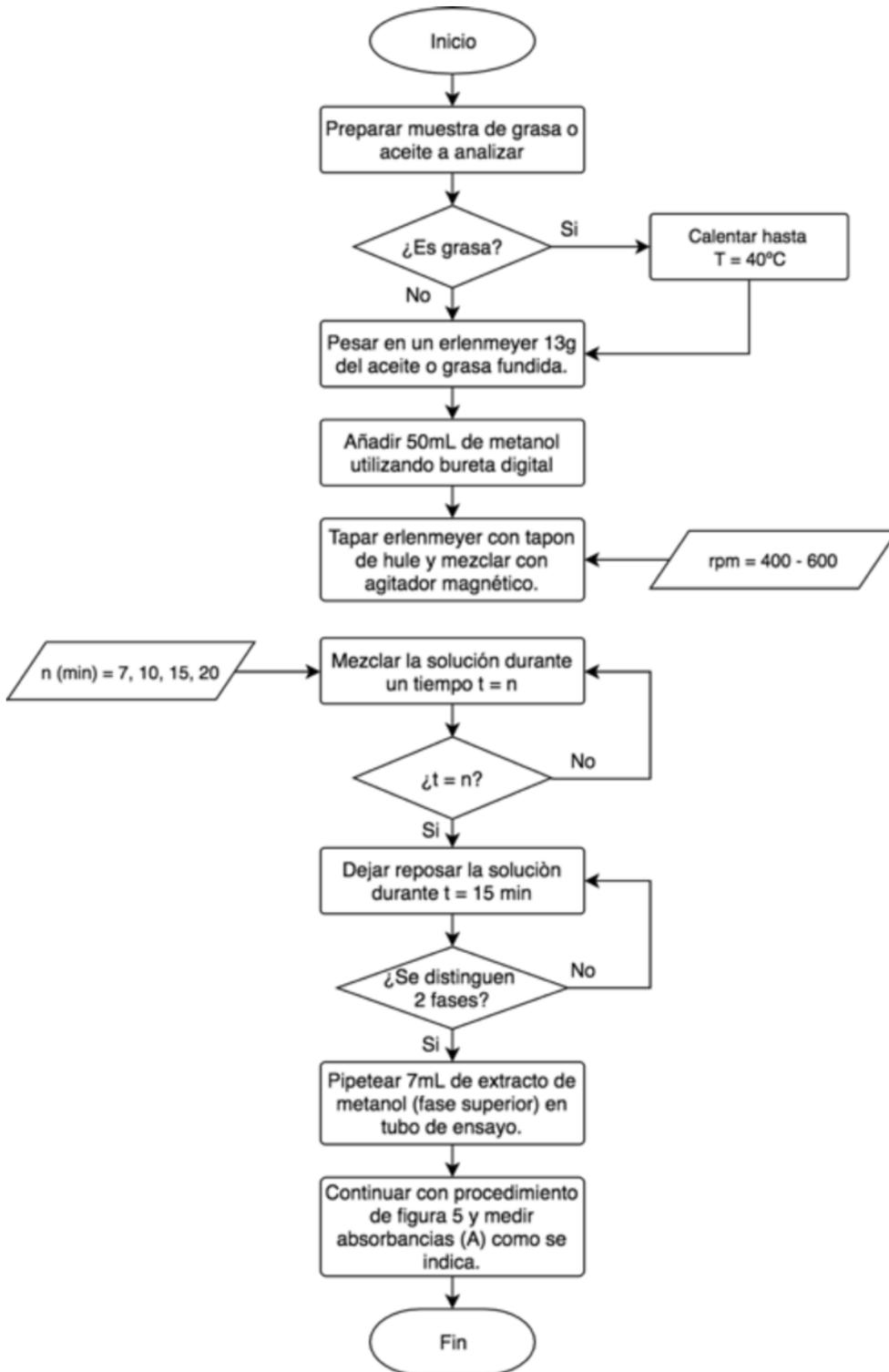
Fuente: elaboración propia.

Figura 10. **Determinación de límites de detección y cuantificación**



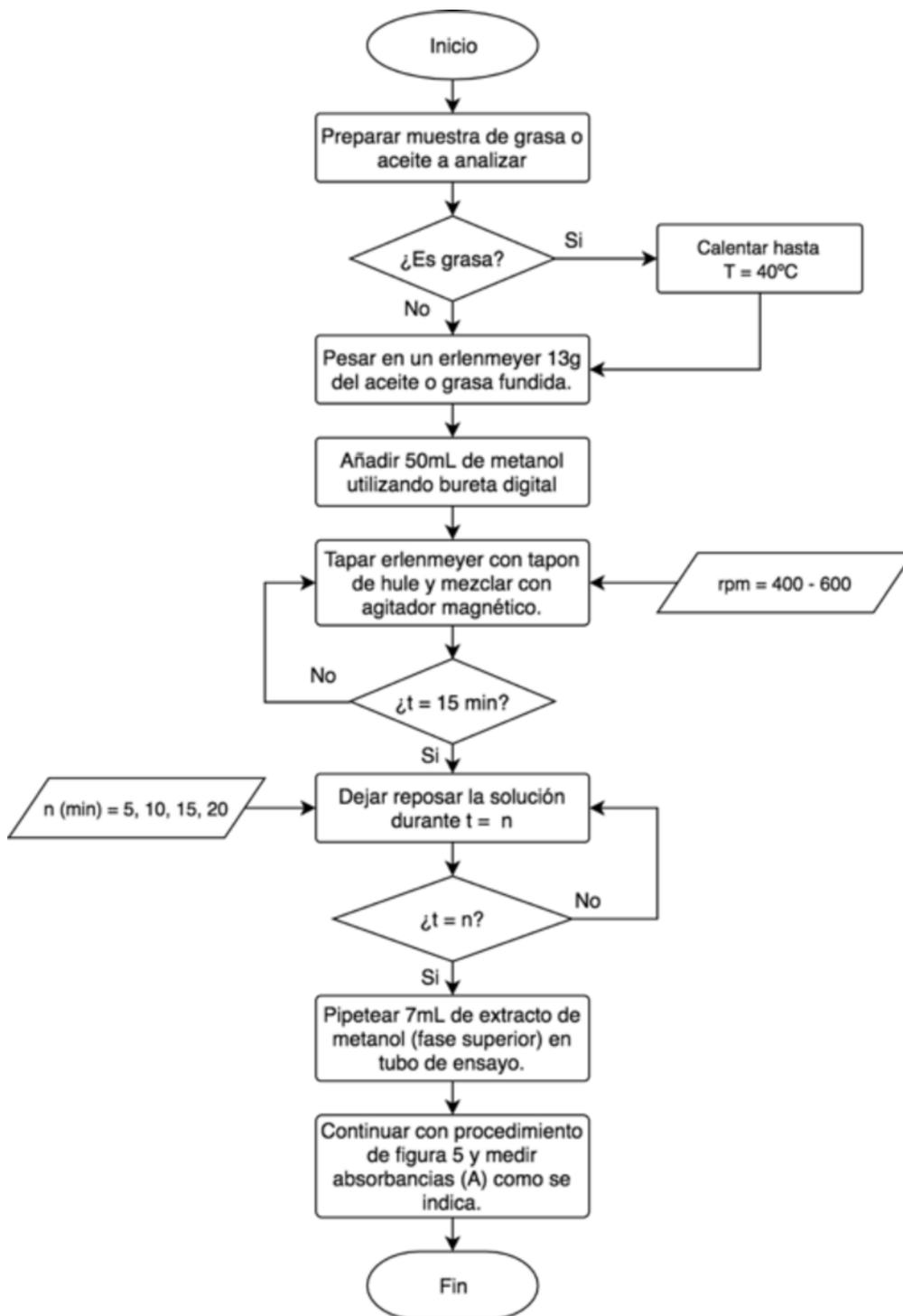
Fuente: elaboración propia.

Figura 11. Evaluación de robustez variando tiempo de agitación



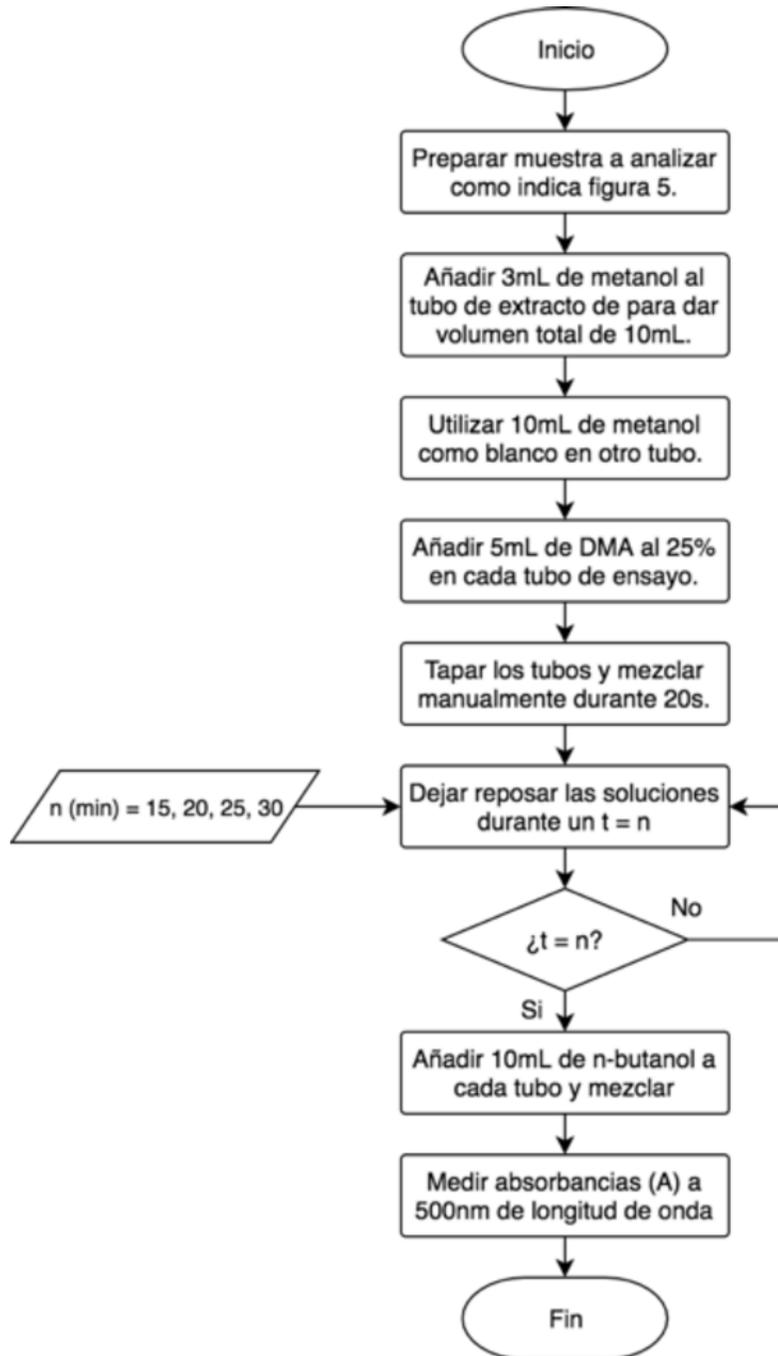
Fuente: elaboración propia.

Figura 12. Evaluación de robustez variando tiempo de reposo de separación de fases



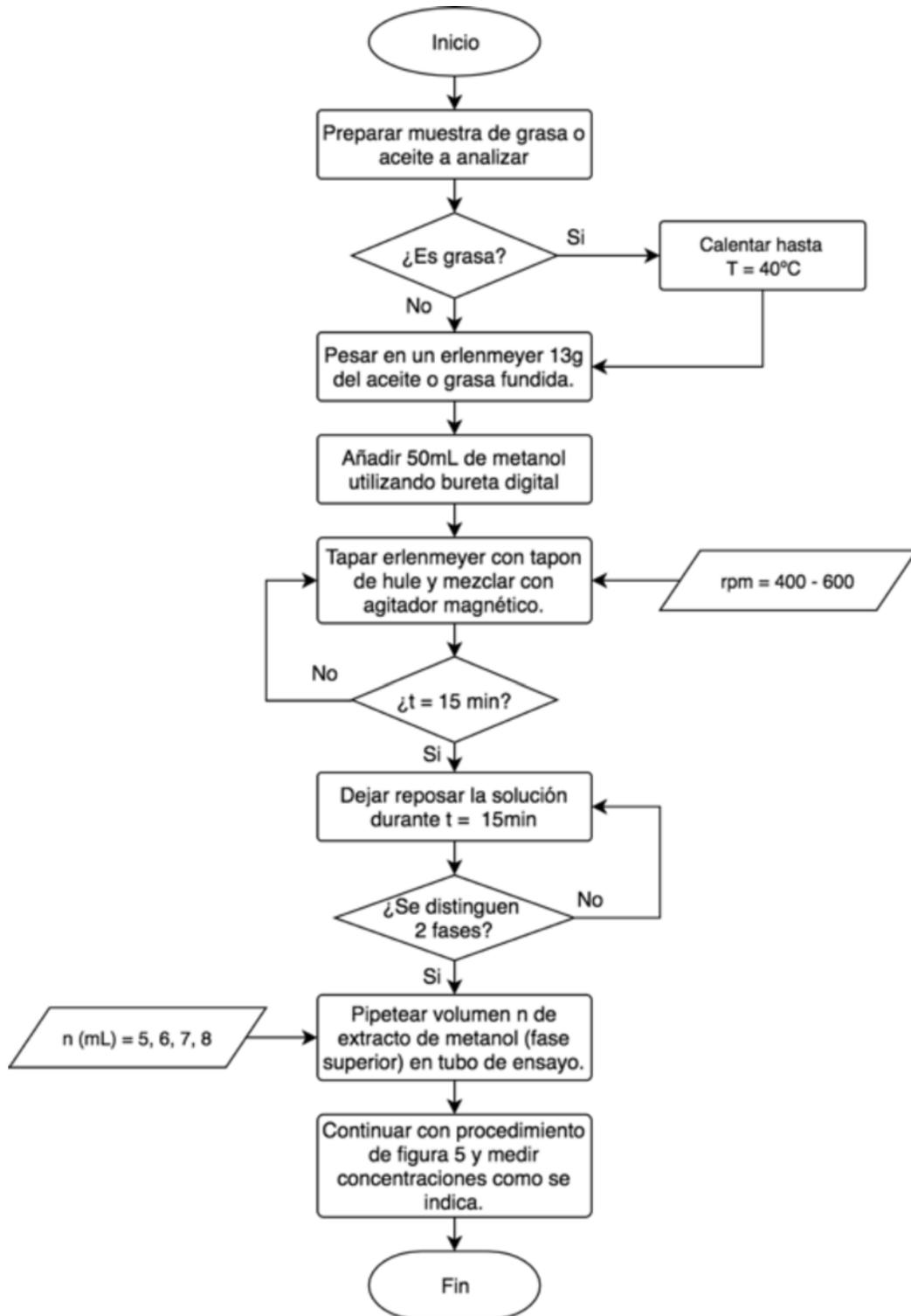
Fuente: elaboración propia.

Figura 13. Evaluación de robustez variando tiempo de reposo de muestra con dimetilamina



Fuente: elaboración propia.

Figura 14. Evaluación de robustez variando volumen de extracto



Fuente: elaboración propia.

3.9. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

A continuación, se presenta el formato de las tablas que se utilizaron para recolectar la información obtenida en los experimentos de la investigación.

Tabla III. **Formato de recolección de datos para la curva de calibración y parámetros de linealidad y sensibilidad**

Dilución (mL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{alícuota}$)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
0	0			
1	100			
2	200			
3	300			
4	400			
5	500			
6	600			
7	700			
8	800			
9	900			
10	1 000			

Fuente: elaboración propia.

Tabla IV. **Formato de recolección de datos de absorbancias para determinación de exactitud**

	No. De muestra					
	1	2	3	4	5	6
A1						
A2						
A3						

Fuente: elaboración propia.

Tabla V. **Formato de recolección de datos de absorbancias para determinación de límites de detección y cuantificación**

No. Muestra	Absorbancia de blancos		
	A1	A2	A2
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			

Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Formato de recolección de datos de absorbancias para análisis de repetibilidad**

No. Analista	No. Repetición	No. Muestra					
		1	2	3	4	5	6
1	1						
	2						
	3						
2	1						
	2						
	3						
3	1						
	2						
	3						

Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Formato de recolección de datos de absorbancias para análisis de precisión intermedia**

No. Día	No. Analista	No. Repetición	No. Muestra					
			1	2	3	4	5	6
1	1	1						
		2						
		3						
	2	1						
		2						
		3						
	3	1						
		2						
		3						
2	1	1						
		2						
		3						
	2	1						
		2						
		3						
	3	1						
		2						
		3						

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. **Formato de recolección de datos de absorbancia para evaluación de robustez variando tiempo de agitación**

No. Muestra	Tiempo agitación (min)			
	7	10	15	20
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. **Formato de recolección de datos de absorbancia para evaluación de robustez variando tiempo de reposo para separación de fase extracto**

No. Muestra	Absorbancia por tiempo reposo separación de fases (min)			
	5	10	15	20
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Formato de recolección de datos para evaluación de robustez variando tiempo de reposo de extracto con solución de dimetilamina**

No. Muestra	Absorbancia por tiempo de reposo en solución con DMA (min)			
	5	10	15	20
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Formato de recolección de datos para evaluación de robustez variando volumen de extracto de metanol para ensayo**

No. Muestra	Absorbancia por volumen de extracto de metanol (mL)			
	5	6	7	8
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Formato de recolección de datos de absorbancia para cada tipo de muestra**

Tipo	No. Muestra	A1	A2	A2
Aceite	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
Manteca	10			
	11			
	12			
	13			
	14			
	15			
Margarina	16			

Fuente: elaboración propia.

3.10. Análisis estadístico

Se utilizó la estadística descriptiva como herramienta para validar los resultados obtenidos. Se presentan a continuación los parámetros empleados:

3.10.1. Media aritmética

Dado que se realizaron varias repeticiones del experimento, se tomó un valor promedio de los valores de absorbancia obtenidos. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$$

Donde:

\bar{x} = media aritmética

$\sum_{i=1}^n a_i$ = sumatoria de valores

n = número de datos

3.10.2. Desviación estándar

Este parámetro estadístico se utilizó para evaluar el nivel de coincidencia entre los resultados obtenidos de las diferentes repeticiones del experimento. La ecuación empleada es la siguiente:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Donde:

σ = desviación estándar

\bar{x} = valor promedio

x_i = valor de la muestra

N = número de datos

3.10.3. Coeficiente de variación

Este parámetro estadístico se utilizó para evaluar la relación existente entre la desviación típica de la muestra y su media. La ecuación empleada es la siguiente:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100 \%$$

Donde:

CV = coeficiente de variación

σ = desviación estándar

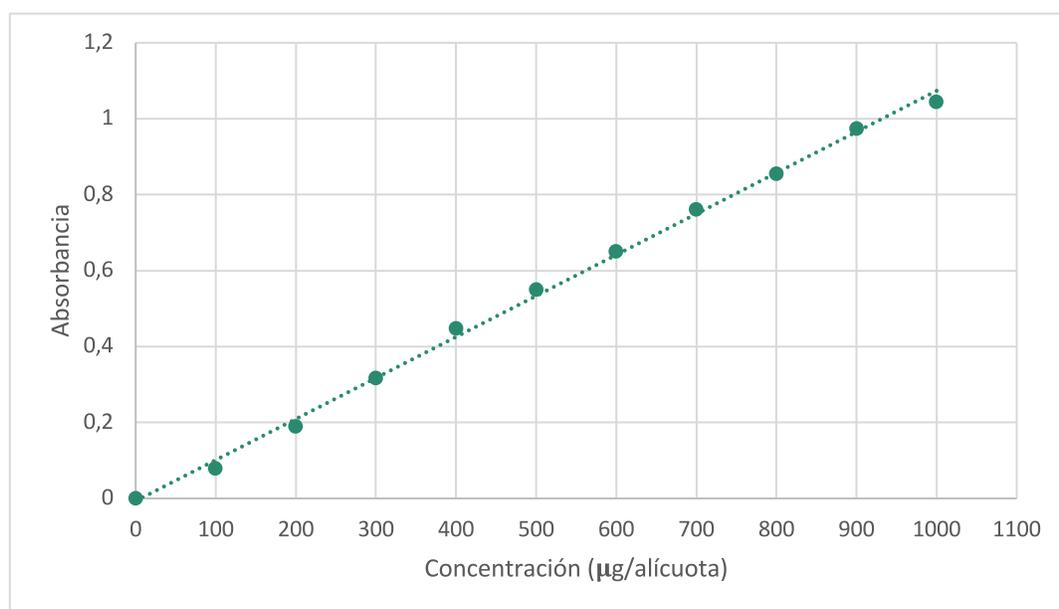
x = valor promedio

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de linealidad y sensibilidad de la metodología mediante la caracterización de la absorbancia en función de la concentración de terbutil hidroquinona (TBHQ)

A continuación, se presenta la curva de calibración obtenida con el espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS, de la cual se determinó la linealidad utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (R) y la sensibilidad del método mediante la pendiente de su línea de tendencia.

Figura 15. Curva de calibración para determinación de terbutil hidroquinona (TBHQ)



Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 6.

Tabla XIII. **Evaluación de linealidad y sensibilidad mediante curva de calibración del método**

Ecuación lineal	A = 0,0011 C - 0,0764
Rango de linealidad	0 – 1 000 µg/alícuota
Coefficiente de correlación de Pearson (R)	0,9989
Coefficiente de determinación (R ²)	0,9978
Pendiente de la recta	0,011
Incerteza máxima de variable dependiente	0,001 A

Fuente: elaboración propia, con información de la figura 15.

4.2. Evaluación de precisión del método en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia

Se presentan los resultados de la evaluación de precisión del método utilizando como herramienta el análisis de repetibilidad, estimado por separado a tres diferentes analistas de laboratorio en un mismo día.

Tabla XIV. **Valores de repetibilidad por analista**

No. Analista	Parámetros de evaluación	Absorbancias por No. muestra					
		1	2	3	4	5	6
1	Absorbancia promedio (UA)	0,036	0,042	0,074	0,149	0,133	0,196
	Desviación estándar (UA)	0,00000	0,00047	0,00047	0,00047	0,00082	0,00082
	Coefficiente de variación (%)	0,0000	1,1136	0,6399	0,3157	0,6139	0,4166
2	Absorbancia promedio (UA)	0,035	0,042	0,075	0,149	0,133	0,194
	Desviación estándar (UA)	0,00047	0,00082	0,00121	0,00082	0,00082	0,00243
	Coefficiente de variación (%)	1,3598	1,9440	1,6214	0,5480	0,6139	1,2530
3	Absorbancia promedio (UA)	0,035	0,042	0,076	0,149	0,133	0,191
	Desviación estándar (UA)	0,00047	0,00094	0,00000	0,00094	0,00082	0,00047
	Coefficiente de variación (%)	1,3598	2,2627	0,0000	0,6342	0,6139	0,2464

Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 10.

Tabla XV. **Desviación estándar y coeficiente de variación promedio por analista**

No. Analista	Desviación estándar (UA)	Coeficiente de variación (%)
1	0,00051	0,51660
2	0,00109	1,22336
3	0,00061	0,85284

Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 10.

Se presentan los resultados de la evaluación de precisión del método utilizando como herramienta el análisis de precisión intermedia, realizado mediante el desarrollo del método por parte de 3 analistas en 2 distintos días de la semana.

Tabla XVI. **Valores de precisión intermedia**

	No. Muestra					
	1	2	3	4	5	6
Absorbancia media (UA)	0,035	0,042	0,075	0,149	0,134	0,193
Desviación estándar (UA)	0,00088	0,00087	0,00117	0,00133	0,00147	0,00170
Coeficiente de variación (%)	2,4960	2,0842	1,5521	0,8929	1,0972	0,8822

Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 10.

4.3. Evaluación de exactitud del método mediante ensayo de recuperación

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de exactitud del método, mediante la realización de un ensayo de recuperación y su aprobación según los criterios óptimos.

Tabla XVII. **Criterios de aceptación para parámetro de exactitud**

Rango menor de recuperación (%)	90,949
Rango mayor de recuperación (%)	109,051
Pendiente de recta	≥ 0,95

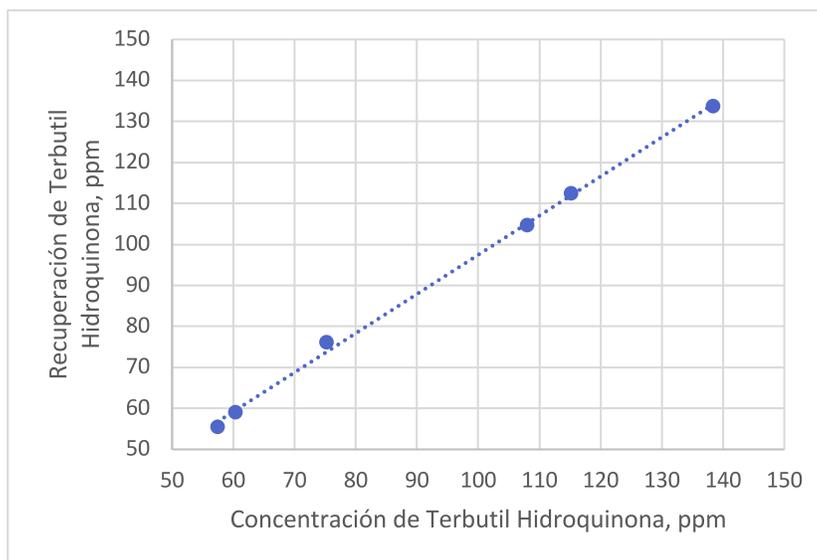
Fuente: elaboración propia, con información de inciso 2.1.1 de la Guía OGA-GEC-016.

Tabla XVIII. **Exactitud del método por ensayo de recuperación**

No. De muestra	1	2	3	4	5	6
Desviación estándar (UA)	0,00047	0,00094	0,00000	0,00082	0,00094	0,00047
Coefficiente de variación (%)	1,3598	2,2627	0,0000	0,6139	0,6342	0,2464
Concentración validada (ppm)	57,417	60,320	75,221	108,054	115,140	138,431
Concentración de ensayo (ppm)	55,478	58,974	76,124	104,595	112,421	133,733
Porcentaje de recuperación (%)	96,623	97,769	101,200	96,799	97,638	96,606

Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 8.

Figura 16. **Relación unitaria entre la cantidad de terbutil hidroquinona de la muestra y la cantidad de TBHQ recuperada**



Fuente: elaboración propia, con información de la tabla XVIII.

Tabla XIX. **Evaluación de recuperación mediante relación unitaria de Concentraciones de terbutil hidroquinona (TBHQ)**

Ecuación lineal	$y = 0,9565 x + 1,814$
Rango de linealidad	0 – 140 ppm
Coefficiente de correlación de Pearson (R)	0,99917
Coefficiente de determinación (R^2)	0,99835
Pendiente de la recta	0,9565

Fuente: elaboración propia, con información de la figura 16.

4.4. Establecimiento de límites de detección y cuantificación para la metodología espectrofotométrica

Se presentan los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación, mediante mediciones de blancos.

Tabla XX. **Parámetros de detección y cuantificación de la metodología**

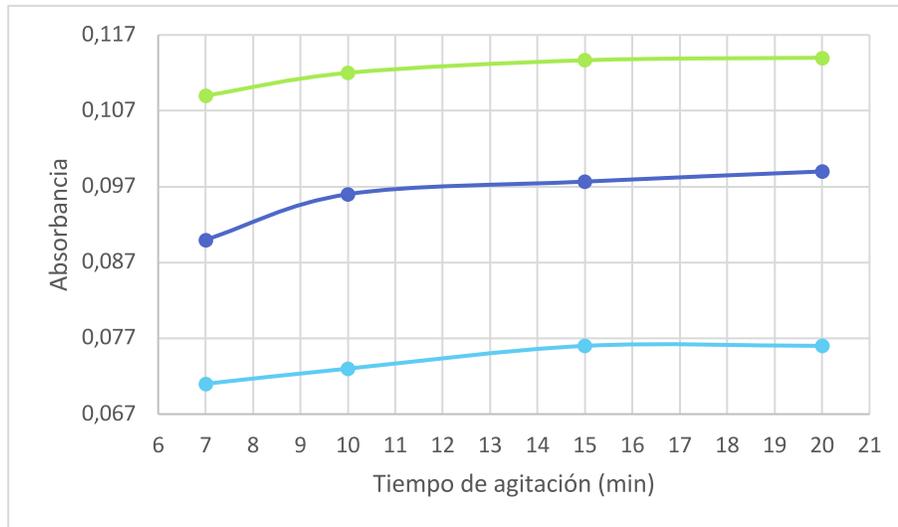
Límite de detección (ppm)	39,27
Límite de cuantificación (ppm)	40,75

Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 9.

4.5. **Evaluación de robustez por medio de la variación de las condiciones de trabajo en el desarrollo de la metodología**

A continuación, se presenta gráficamente el comportamiento en los resultados de la metodología al realizar variaciones en las condiciones de trabajo. Para la presentación gráfica se tomaron únicamente 3 muestras. Las evaluaciones de robustez del total de 10 muestras se encuentran en el apéndice 11.

Figura 17. **Comportamiento de absorbancia de muestras al variar tiempo de agitación de aceite o grasa con metanol**



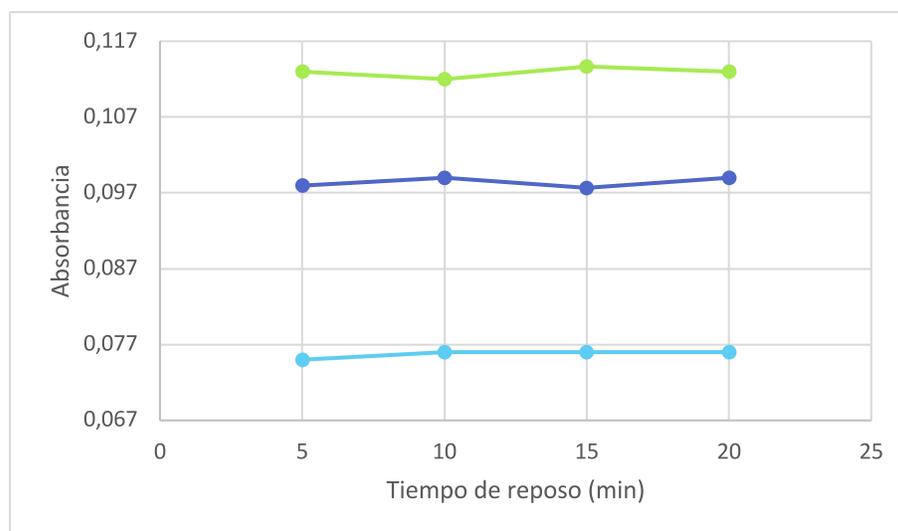
Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 11.

Tabla XXI. **Evaluación de robustez por variación de tiempo de agitación de aceite o grasa vegetal con metanol**

Color	No. muestra	Rango de comportamiento con tendencia constante (min)
	4	15 – 20
	5	15 – 20
	6	15 – 20

Fuente: elaboración propia, con información de la figura 17.

Figura 18. **Comportamiento de absorbancia al variar tiempo de reposo para separación de fase de extracto de metanol**



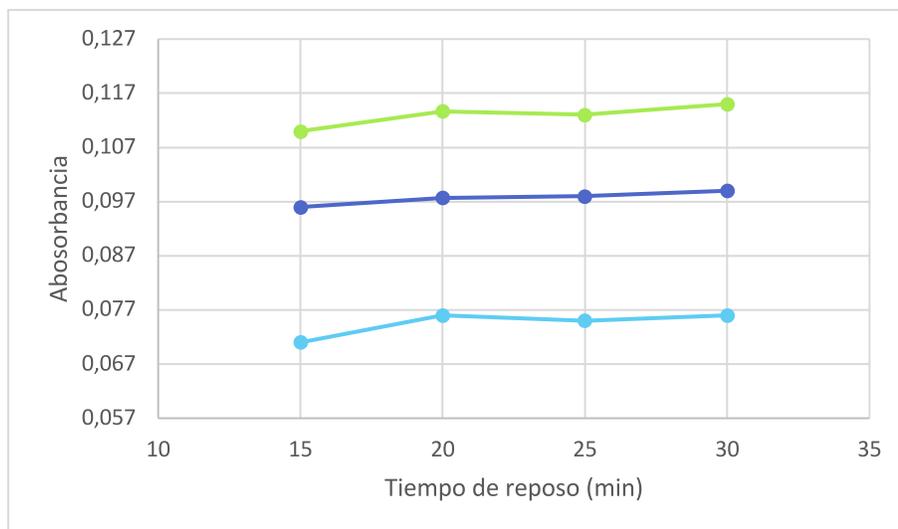
Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 11.

Tabla XXII. **Evaluación de robustez por variación de tiempo de reposo para separación de fase de extracto de metanol**

Color	No. muestra	Rango de comportamiento con tendencia constante (min)
	4	5 – 20
	5	5 – 20
	6	5 – 20

Fuente: elaboración propia, con información de la figura 18.

Figura 19. **Comportamiento de absorbancia de muestras al variar tiempo de reposo de extracto de metanol con solución de dimetilamina (DMA)**



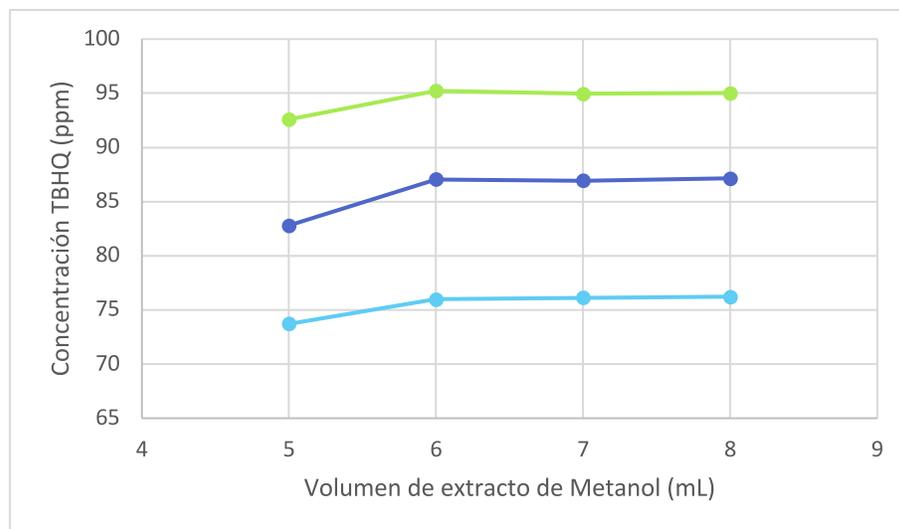
Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 11.

Tabla XXIII. **Evaluación de robustez por variación de tiempo de reposo de extracto de metanol con solución de dimetilamina**

Color	No. muestra	Rango de comportamiento con tendencia constante (min)
Blue	4	20 – 30
Cyan	5	15 – 30
Green	6	20 – 30

Fuente: elaboración propia, con información de la figura 19.

Figura 20. **Comportamiento de concentración de terbutil hidroquinona (TBHQ) al variar volumen de extracto de metanol utilizado en el análisis**



Fuente: elaboración propia, con información del apéndice 11.

Tabla XXIV. **Evaluación de robustez por variación de volumen de extracto de metanol utilizado para análisis**

Color	No. muestra	Rango de comportamiento con tendencia constante (mL)
Blue	4	6 – 8
Cyan	5	6 – 8
Green	6	6 – 8

Fuente: elaboración propia, con información de la figura 20.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En esta parte del trabajo se muestra la validación de una metodología cuantitativa con el fin de lograr la aceptación de los resultados dentro de la empresa, mediante la evaluación de los parámetros de rendimiento del método.

La técnica colorimétrica de determinación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites vegetales, puede emplearse alternativamente para la cuantificación mediante un procedimiento analítico espectrofotométrico.

En base al objetivo general, se realizó la obtener resultados válidos, se construyó la curva de calibración de la figura 15. Para la cual se preparó una serie de soluciones patrones de distintas concentraciones de terbutil hidroquinona (TBHQ), leyéndose por triplicado (ver apéndice 6).

El rango de linealidad de esta gráfica, es de 0 – 1 000 $\mu\text{g}/\text{alícuota}$ según la tabla XIII, permite obtener el intervalo de concentraciones en el cual los resultados presentan una relación lineal entre las absorbancias y la concentración. La linealidad determina la región de la curva de cuantificación en la que existe relación directa entre la señal instrumental y la concentración del analito. Se define que un método es lineal cuando presenta un coeficiente de correlación (R) $> 0,99$, por lo cual a través de la tabla XIII se comprueba que la metodología es lineal debido al valor de 0,9989 del coeficiente R .

Por otro lado, la sensibilidad del método se pone en evidencia por medio de la pendiente de la curva de calibración en la figura 15. Se establece que cuanto mayor es la pendiente, el método es más sensible.³ En la tabla XIII se define que la pendiente de la recta de la figura 15 es de 0,011, lo que indica que el método tiene la capacidad de distinguir con determinado nivel de confianza, dos concentraciones próximas.

Seguido de ello se realizó la evaluación de la precisión de la metodología, la cual refleja la reproducibilidad de las medidas, es decir, la cercanía entre los resultados obtenidos entre sí. Este es el grado de concordancia entre ensayos independientes en condiciones estipuladas. Para ello se valoró la precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Para la evaluación de repetibilidad se realizaron tres ensayos, cada uno con diferente analista. Esto con el fin de evaluar la desviación de cada analista por separado y así recomendar al más apto para el desarrollo de la metodología. Como se puede observar en la tabla XIV, se determinó el coeficiente de variación de las muestras. Los valores de coeficiente de variación por debajo del 1,5 % en este análisis son considerados aceptables, por ende, el método se califica como preciso en condiciones de repetibilidad ya que el coeficiente de variación global de cada analista es menor al 1,5 % según tabla XV.

Respecto de la evaluación de precisión intermedia, las determinaciones fueron desarrolladas tres veces el mismo día a través de tres diferentes analistas del laboratorio. Se repitió este procedimiento nuevamente un día distinto de la semana, haciendo un total de dos días de evaluaciones. En la tabla XVI se puede

³ RODRÍGUEZ, Silvia., PELLERANO, Roberto., ROMERO, César. *et al. Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de Citrus reticulata. Tumbaga. 7, 55-71. p. 62*

observar que los coeficientes de variación más altos que se obtuvieron tienen valores de 2,4960 % y 2,0842 %. Sin embargo, los valores de coeficiente de variación por debajo del 2,5 % en análisis de precisión intermedia son considerados aceptables, por lo tanto, el método se califica como preciso en condiciones de precisión intermedia.

Por medio de la tabla XV se indica que el analista No. 1 es el más apto para el desarrollo de la metodología espectrofotométrica para cuantificación de antioxidante, en caso de necesitar más analistas, el No. 2 y No. 3 pueden sustituirle por poseer coeficientes de variación (CV) menores al 1,5 %.

Para definir si el método es apto para expresar resultados de concentración próximos al valor real de la muestra, se procedió a evaluar la exactitud del método por medio de ensayos de recuperación. En estos ensayos se procedió a utilizar seis muestras, cuya concentración se validó por medio del método normalizado de cromatografía líquida de alta resolución a través de un laboratorio externo certificado. Luego de ello las mismas muestras fueron evaluadas con la metodología espectrofotométrica, dando los resultados de la tabla XVIII.

Se utilizaron los criterios de evaluación de la tabla XVII en la cual se define que los resultados que se encuentren entre 90,9 % y 109,1 % están dentro del rango aceptable. Según la tabla XVIII los porcentajes mínimo y máximo de recuperación obtenidos son 96,6 % y 101,2 %, indicando que el método de cuantificación espectrofotométrica da resultados aceptables.

Los resultados obtenidos en el ensayo de recuperación fueron analizados mediante la figura 16 de relación entre la cantidad de antioxidante según método normalizado (eje x) y la cantidad de antioxidante según metodología

espectrofotométrica (eje y). Se observó una escasa dispersión de los datos obtenidos del ensayo de recuperación.

Al graficar la respuesta del ensayo, la pendiente que se obtuvo fue de 0,9565 según tabla XIX. Estando este valor dentro de los criterios de aceptación definidos en la tabla XVII. Después de verificar todos los criterios de exactitud, se define que la metodología de cuantificación permite obtener resultados próximos a la media de una serie de resultados obtenidos con el método al valor real.

Por otro lado, se determinaron límites de detección y cuantificación para la metodología por validar. El límite de detección se define como la concentración del analito que produce una respuesta con un factor de confianza tres veces mayor que la desviación estándar del blanco. Por ello se realizaron distintas mediciones de blancos en el apéndice 8. Dando como resultado un límite de detección de 39,27 ppm según la tabla XX.

Con las mismas mediciones del apéndice 8 se determinó el límite de cuantificación de la metodología, que es la mínima concentración de analito que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de incertidumbre. En la tabla XX se puede observar que el valor del límite de cuantificación para esta metodología espectrofotométrica es de 40,75 ppm.

La robustez es una medida de la capacidad que tiene el método analítico de permanecer inalterado por pequeñas variaciones en el procedimiento del método. Con ello, es posible determinar qué variables son más significativas en el momento de desarrollar la metodología y que, por lo tanto, deben ser controladas.⁴

⁴ JURADO, José. Aplicación de Microsoft Excel a la química analítica: validación de métodos analíticos p. 12.

El objetivo de la robustez es describir en qué condiciones establecidas se pueden obtener resultados confiables, de manera que el procedimiento funcione, si se utiliza después de intervalos de tiempo largo o con pequeños cambios en la rutina. Una metodología es más robusta cuanto menos dependa de una rutina estricta.

Para evaluar la robustez de la metodología de cuantificación de antioxidante se realizaron variaciones en las condiciones de trabajo, entre estas: el tiempo de agitación del aceite o grasa vegetal con metanol, el tiempo de reposo de la muestra para separación de fase extracto de metanol, el tiempo de reposo de extracto de metanol con solución de dimetilamina y el volumen de extracto de metanol utilizado en el análisis.

La figura 17 muestra el comportamiento de las absorbancias al variar el tiempo de agitación de la muestra de aceite o grasa con metanol, esto para extraer el antioxidante del aceite debido a su alta solubilidad en metanol. Tal como se observa en la figura 17. El tiempo de agitación es una variable que debe controlarse en la metodología ya que, en tiempos menores a 15 min, los resultados no son confiables. En la tabla XXI se define que el comportamiento de las absorbancias con tendencia constante inicia en los 15 min. Esto quiere decir que a partir de los 15 minutos de agitación los resultados son precisos y que no tendrán variaciones con tiempos de agitación mayores a este.

En la figura 18 se presenta el comportamiento de las absorbancias al variar el tiempo de reposo que se le da a la muestra para que la fase de extracto de metanol se separe de la grasa. Como se observa en la figura 18, las absorbancias tienden a ser constantes iniciando desde los 5 min de reposo indicados en tabla XXII. Indicando que la variable del tiempo de reposo no es significativa al

momento de desarrollar la metodología, por ende, los resultados serán próximos a la realidad sin importar el tiempo que se dejen reposar la fase grasa y extracto.

Seguidamente se evaluó el comportamiento de las absorbancias al variar el tiempo de reposo del extracto de metanol con dimetilamina (DMA), cabe mencionar que durante este tiempo de reposo se colorea la muestra debido a la afinidad de la dimetilamina con los fenoles del antioxidante. Como se observa en la figura 19, el tiempo de reposo es una variable que debe controlarse, ya que cuando el tiempo es menor a 20 min la muestra no se colorea con la intensidad adecuada, provocando lecturas incorrectas de absorbancia.

Según la evaluación de la tabla XXIII en base a la figura 19 el tiempo con el cual las lecturas de absorbancias no tendrán lecturas erróneas es igual o mayor a 20 min.

Finalmente, en la figura 20 se muestra el comportamiento de la concentración de antioxidante al realizar variaciones del volumen de extracto de metanol utilizado en el análisis. Para verificar la robustez de este análisis se utilizaron concentraciones y no absorbancias debido a que, a mayor volumen de extracto, mayor intensidad de coloración y, por ende, las lecturas de absorbancia obtendrían diferencias. Por ello, para realizar un correcto análisis se utilizó la concentración de antioxidante debido a que al utilizar la ecuación definida en la figura 5, el volumen de extracto utilizado para análisis cambia el valor V_{ext} de la ecuación.

Por medio de la tabla XXIV, se observa que al utilizar 6 mL de volumen como mínimo para el análisis, las mediciones dan concentraciones precisas, mientras que, al utilizar volumen menor a este, la concentración da como

resultado un valor menor el cual es incorrecto. Por lo que el volumen de extracto es una variable significativa para el desarrollo de la metodología.

CONCLUSIONES

1. La metodología de fácil manejo y aplicación para la cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en grasas y aceites vegetales, presenta resultados confiables en base a la validación realizada debido a que cumple con todos los parámetros de validación solicitados en la Política de Selección y Validación de métodos OGA-GEC-016.
2. La metodología propuesta posee un comportamiento lineal debido al valor de su coeficiente de correlación de Pearson (R) igual a 0,9989. La sensibilidad del método tiene un valor de 0,011, indicando que el método es capaz de distinguir concentraciones próximas.
3. En los ensayos de repetibilidad los coeficientes de variación son menores al 1,5 % y en el de precisión intermedia fueron menores al 2,5 %, exhibiendo la precisión de la metodología de cuantificación.
4. El ensayo de recuperación presenta resultados de recuperación entre 90,9 % y 109,1 % y una pendiente en su caracterización igual a 0,9565, definiendo la metodología apta para demostrar resultados exactos.
5. Los límites de detección y cuantificación de la metodología espectrofotométrica son 39,27 ppm y 40,75 ppm, respectivamente.
6. Se comprobó la robustez de la metodología en cuanto al tiempo de reposo de separación de fase extracto de metanol. Las variaciones de tiempo de agitación de grasa con metanol, tiempo de reposo de extracto de metanol

con dimetilamina (DMA), y volumen de extracto de metanol utilizado en análisis sí inciden en los resultados obtenidos a partir de un punto específico.

RECOMENDACIONES

1. Implementar la metodología espectrofotométrica de cuantificación de antioxidante terbutil hidroquinona (TBHQ) en el laboratorio fisicoquímico de la empresa refinadora de grasas y aceites, según el procedimiento actual.
2. Realizar calibraciones trimestralmente al espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS para asegurar la correcta medición de absorbancias.
3. Designar al analista No. 1 para el desarrollo de la metodología espectrofotométrica para cuantificación de antioxidante, en caso de necesitar más analistas, el No. 2 y No. 3 pueden sustituirle por poseer coeficientes de variación (CV) menores al 1,5 %.
4. Verificar que los analistas realicen la metodología con los tiempos indicados en el procedimiento debido a que son variables significativas en los resultados de absorbancia.
5. Realizar la compra de más celdas espectrofotométricas de 10mm para aumentar la rapidez con la que se realizan las mediciones. Actualmente, solo se tienen dos dentro del laboratorio.
6. Solicitar al proveedor del espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS el software VISIONlite para dejar registrada la curva de calibración desarrollada para el método y disminuir el error residual.

BIBLIOGRAFÍA

1. DAFFAU, Boris., ROJAS, Fabiola., GUERRERO, Isabel., *et al.* *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* Santiago, Chile: Instituto de Salud Pública. 2010. 67 p.
2. ESMIOL, Sophie. *Aceite de palma: usos, orígenes e impactos.* 2008. Madrid, España: Amigos de la tierra. [en línea]. Recuperado de: http://www.guana-guides.org/wp-content/uploads/2018/09/Aceite_de_Palma.pdf [Consulta: marzo de 2017]
3. GÓMEZ-NAPIER, Lidia., GALLO, D., SUÁREZ, M. *et al.* *Fundamentos de la normalización, metrología y control de calidad.* Centro Nacional de Enseñanza en Normalización. La Habana, Cuba. 1980. 309 p.
4. HARRIS, Daniel. *Análisis químico cuantitativo.* Barcelona, España: Reverté. 2007. 924 p.
5. *International Organization for Standardization. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.* (ISO/IEC 17025:2017). Ginebra, Suiza: ISO. 2017. 13 p.

6. JURADO, José. *Aplicación de Microsoft Excel a la química analítica: Validación de métodos analíticos*. Universidad de Sevilla – Departamento de química analítica. Sevilla, España. 2008. 47 p.
7. Oficina Guatemalteca de Acreditación. *Guía técnica guatemalteca: política de selección y validación de métodos de ensayo*. (OGA-GEC-016). Guatemala, Guatemala: OGA. 2007. 29 p.
8. PATTERSON, H.B.W. *Bleaching and purifying fats and oils: theory and practice*. Champaign, EE.UU: American Oil Chemists Society. 1992. 242 p.
9. RANGANNA, S. *Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*. 2a ed. Nueva Delhi, India: Tata McGraw-Hill. 1986. 1093 p.
10. RODRÍGUEZ, Silvia. PELLERANO, Roberto., ROMERO, César., *et al.* *Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de Citrus reticulata*. Tumbaga. 2012. 71 p.
11. SKOOG, Douglas., WEST, Donald., HOLLER, James. *et al.* *Fundamentos de química analítica*. 8a. ed. Barcelona, España: Reverté. 2005. 1088 p.
12. WALPOLE, Ronald., MYERS, Raymond., MYERS, Sharon. *et al.* *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. 9a. ed. Naucalpán de Juárez, México: Pearson Educación. 2012. 816 p.

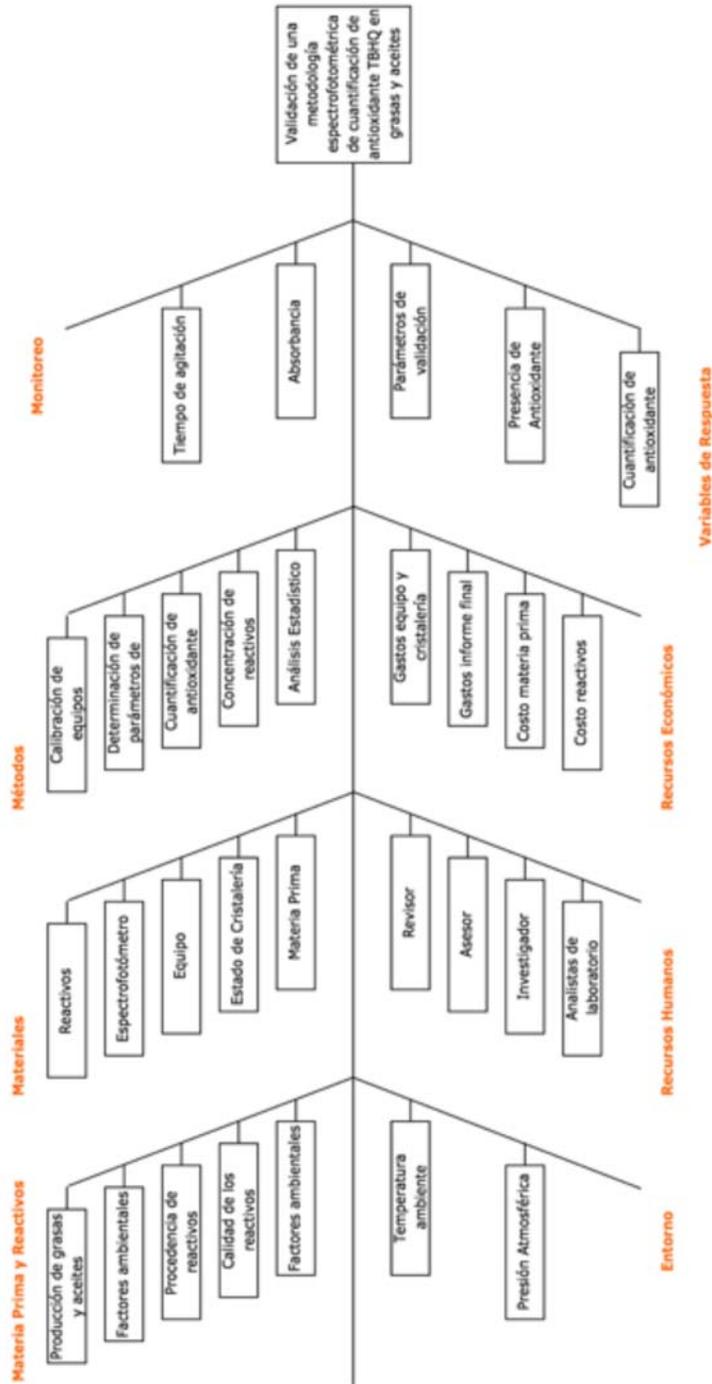
APÉNDICES

Apéndice 1. **Tabla de requerimientos académicos**

Carrera	Área	Tema genérico	Tema específico	Especificación	
Licenciatura en Ingeniería Química	Química	Química inorgánica	Química 3	Estequiometría	
			Química 4	Reacciones químicas	
			Orgánica 2	Expresión de concentraciones	
				Grupos fenólicos	
		Fisicoquímica	Fisicoquímica 2	Hidrogenación	
				Espectrofotometría	
		Operaciones Unitarias	Biología	Lípidos	Grasas y aceites
			Transferencia de masa (IQ4)	Fraccionamiento	Fraccionamiento de aceites
			Procesos industriales	Refinación	Refinación de aceites
	Ciencias básicas y complementarias		Matemática	Matemática básica 1	Ecuaciones lineales
			Estadística	Estadística 1	Estadística descriptiva
				Estadística 2	Análisis de correlación lineal

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. **Tabla de requerimientos académicos**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Equipo de medición espectrofotométrico Genesys 10S UV-VIS**



Fuente. elaboración propia.

Apéndice 4. **Campana de extracción**



Fuente. elaboración propia.

Apéndice 5. **Balanza electrónica ES 320A**

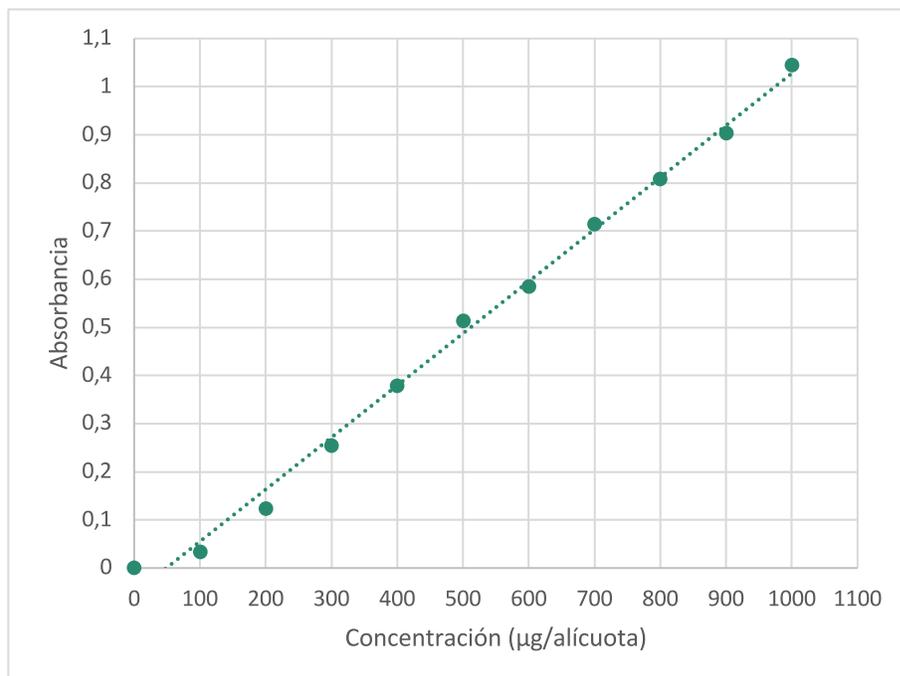


Fuente. elaboración propia.

Apéndice 6. **Absorbancia de solución estándar de metanol en función de la concentración de terbutil hidroquinona para curva de calibración**

Dilución (mL)	Concentración (µg/alícuota)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia media
0	0	0	0	0	0
1	100	0,034	0,037	0,036	0,079
2	200	0,124	0,124	0,122	0,189
3	300	0,254	0,256	0,254	0,317
4	400	0,379	0,381	0,377	0,447
5	500	0,514	0,514	0,516	0,550
6	600	0,585	0,586	0,584	0,651
7	700	0,714	0,716	0,718	0,762
8	800	0,808	0,807	0,808	0,855
9	900	0,904	0,902	0,901	0,973
10	1 000	1,045	1,044	1,044	1,044

- Repetición No, 1

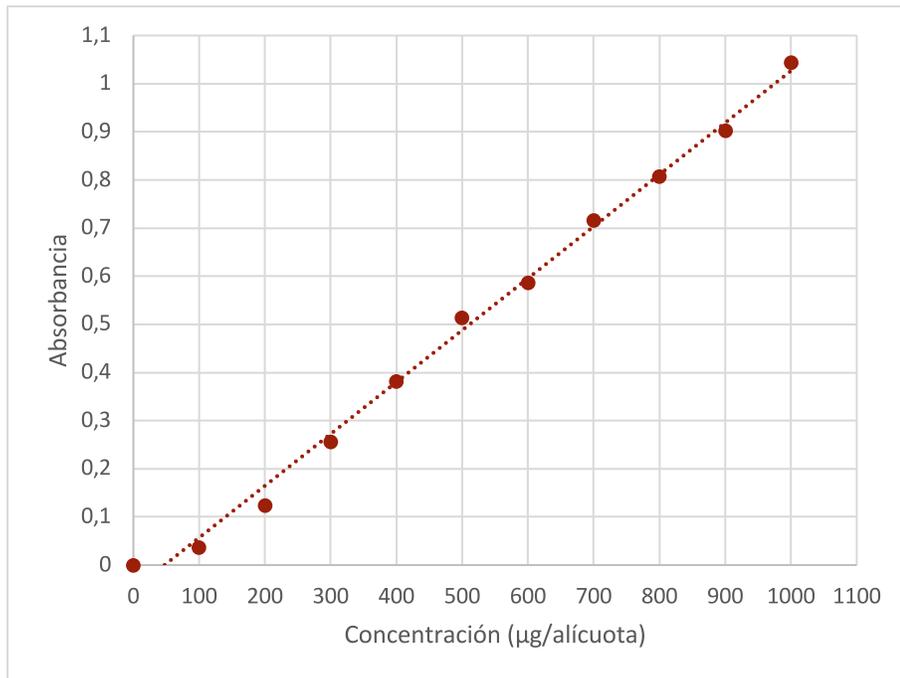


Continuación del apéndice 6.

Ecuación de la curva	$A = 0,011 C - 0,0674$
Rango de linealidad	0 – 1 000 $\mu\text{g}/\text{alícuota}$
Coefficiente de correlación	0,99745
Incerteza máxima de variable dependiente	0,001 A

Fuente. elaboración propia.

- Repetición No. 2

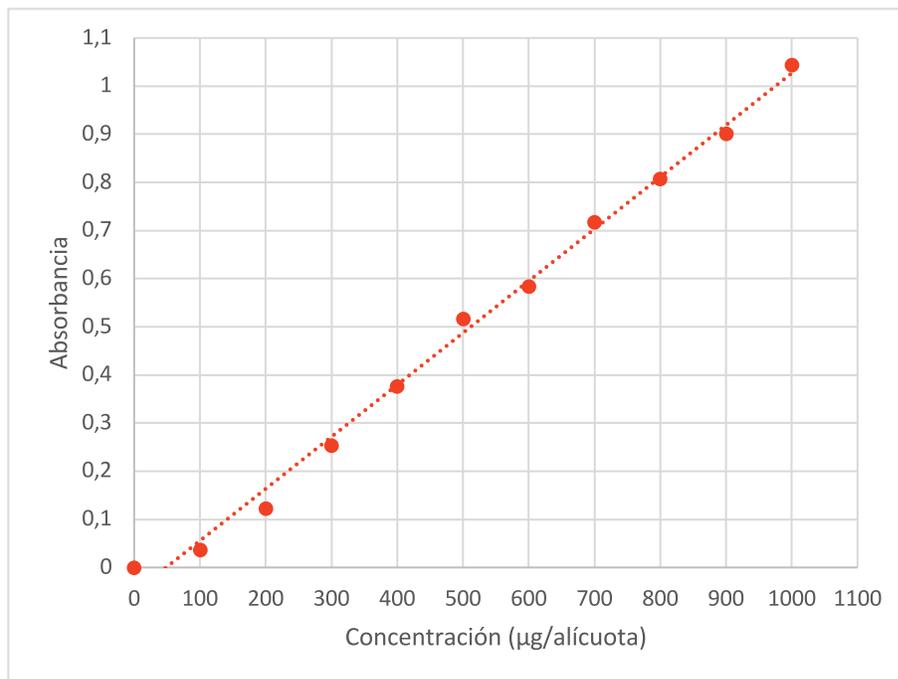


Ecuación de la curva	$A = 0,011 C - 0,0709$
Rango de linealidad	0 – 1 000 $\mu\text{g}/\text{alícuota}$
Coefficiente de correlación	0,9975
Incerteza máxima de variable dependiente	0,001 A

Fuente: elaboración propia.

Continuación del apéndice 6.

- Repetición No. 3

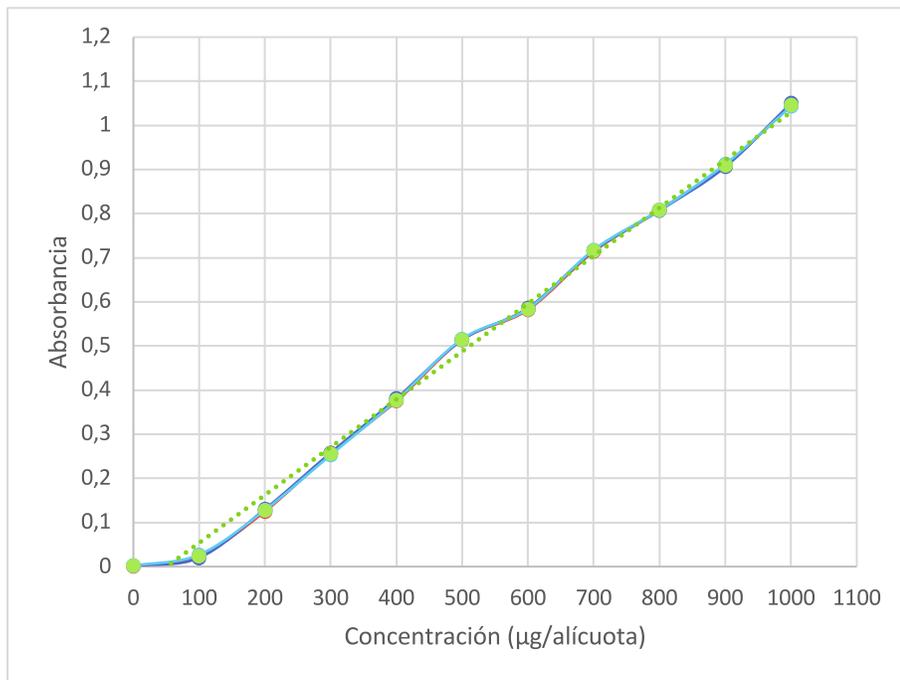


Ecuación de la curva	$A = 0,011 C - 0,0724$
Rango de linealidad	0 – 1 000 µg/alícuota
Coefficiente de correlación	0,9973
Incerteza máxima de variable dependiente	0,001 A

Fuente: elaboración propia.

Continuación del apéndice 6.

- Repeticiones y curva promedio



Ecuación de la curva	$A = 0,011 C - 0,0764$
Rango de linealidad	0 – 1 000 µg/alícuota
Coefficiente de correlación	0,9989
Incerteza máxima de variable dependiente	0,001 A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. **Evaluación de la concentración de terbutil hidroquinona (TBHQ) en distintas grasas y aceites vegetales**

Tipo	No. Muestra	A1	A2	A2	A media	C _{TBHQ} (ppm)
Aceite	1	0,042	0,041	0,041	0,041	58,81
	2	0,034	0,034	0,034	0,034	55,14
	3	0,133	0,132	0,134	0,133	104,60
	4	0,096	0,098	0,099	0,098	86,95
	5	0,075	0,077	0,076	0,076	76,12
	6	0,114	0,112	0,115	0,114	94,94
	7	0,068	0,068	0,067	0,068	71,96
	8	0,149	0,148	0,148	0,148	112,25
	9	0,114	0,112	0,112	0,113	94,44
Manteca	10	0,072	0,076	0,072	0,073	74,79
	11	0,182	0,183	0,183	0,183	129,40
	12	0,125	0,126	0,124	0,125	100,60
	13	0,031	0,029	0,029	0,030	52,98
	14	0,235	0,235	0,235	0,235	155,54
	15	0,085	0,084	0,085	0,085	80,45
Margarina	16	0,227	0,225	0,225	0,226	150,88

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. **Evaluación de exactitud mediante ensayo de recuperación**

- Criterios de aceptación de porcentaje de recuperación para valores de exactitud

Criterios de aceptación		
Rango menor de recuperación (%)	100-4CV	90,949
Rango mayor de recuperación (%)	100+4CV	109,051

- Valores de exactitud

	No. De muestra					
	1	2	3	4	5	6
A1	0,034	0,041	0,076	0,133	0,148	0,192
A2	0,035	0,041	0,076	0,132	0,148	0,191
A3	0,035	0,043	0,076	0,134	0,150	0,191
\bar{A}	0,035	0,042	0,076	0,133	0,149	0,191
σ (AU)	0,00047	0,00094	0,00000	0,00082	0,00094	0,00047
CV (%)	1,3598	2,2627	0,0000	0,6139	0,6342	0,2464
C _{TBHQ} validada (ppm)	57,417	60,320	75,221	108,054	115,140	138,431
C _{TBHQ} de ensayo (ppm)	55,478	58,974	76,124	104,595	112,421	133,733
Recuperación (%)	96,623	97,769	101,200	96,799	97,638	96,606
Cumplimiento de criterios	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. **Evaluación de límites de detección y cuantificación**

No. Muestra	Absorbancia de blancos			\bar{A}
	A1	A2	A2	
1	0,000	0,003	0,000	0,001
2	0,001	0,002	0,000	0,001
3	0,000	0,001	0,002	0,001
4	0,000	0,001	0,001	0,001
5	0,000	0,002	0,002	0,001
6	0,001	0,001	0,000	0,001
7	0,000	0,002	0,001	0,001
8	0,000	0,000	0,000	0,000
9	0,001	0,001	0,000	0,001
10	0,002	0,000	0,001	0,001
11	0,000	0,002	0,001	0,001
12	0,002	0,001	0,000	0,001
13	0,001	0,000	0,000	0,000
14	0,003	0,000	0,001	0,001
15	0,001	0,003	0,001	0,002
16	0,002	0,003	0,000	0,002
Media de blanco (AU)				0,00096
Desviación estándar (AU)				0,00042
Sensibilidad del método				0,0011
Y_{LD} (AU)				0,00223
Y_{LC} (AU)				0,00519
L_D (ppm)				39,27
L_C (ppm)				40,75

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 10. **Evaluación del parámetro de precisión para validación de la metodología**

- Evaluación de precisión en condiciones de repetibilidad realizado a 3 analistas por separado el mismo día.

No. Analista	No. Repetición	Absorbancias por No. Muestra					
		1	2	3	4	5	6
1	1	0,036	0,043	0,074	0,149	0,134	0,197
	2	0,036	0,042	0,074	0,149	0,132	0,195
	3	0,036	0,042	0,073	0,150	0,133	0,196
Ā		0,036	0,042	0,074	0,149	0,133	0,196
σ (AU)		0,00000	0,00047	0,00047	0,00047	0,00082	0,00082
CV (%)		0,0000	1,1136	0,6399	0,3157	0,6139	0,4166

Fuente: elaboración propia.

No. Analista	No. Repetición	Absorbancias por No. Muestra					
		1	2	3	4	5	6
2	1	0,035	0,041	0,075	0,148	0,133	0,193
	2	0,035	0,042	0,076	0,149	0,134	0,191
	3	0,034	0,043	0,077	0,148	0,133	0,193
Ā		0,035	0,042	0,075	0,149	0,133	0,194
σ (AU)		0,00047	0,00082	0,00121	0,00082	0,00082	0,00243
CV (%)		1,3598	1,9440	1,6214	0,5480	0,6139	1,2530

Fuente: elaboración propia.

No. Analista	No. Repetición	Absorbancias por No. Muestra					
		1	2	3	4	5	6
3	1	0,034	0,041	0,076	0,148	0,133	0,192
	2	0,035	0,041	0,076	0,148	0,132	0,191
	3	0,035	0,043	0,076	0,150	0,134	0,191
Ā		0,035	0,042	0,075	0,149	0,133	0,194
σ (AU)		0,00047	0,00082	0,00121	0,00082	0,00082	0,00243
CV (%)		1,3598	1,9440	1,6214	0,5480	0,6139	1,2530

Fuente: elaboración propia.

Continuación del apéndice 10.

- Evaluación de precisión en condiciones de precisión intermedia realizado a 3 analistas en dos distintos días.

No. Día	No. Analista	No. Rep	Absorbancias por No. Muestra					
			1	2	3	4	5	6
1	1	1	0,036	0,043	0,074	0,149	0,134	0,197
		2	0,036	0,042	0,074	0,149	0,132	0,195
		3	0,036	0,042	0,073	0,150	0,133	0,196
	2	1	0,035	0,041	0,075	0,148	0,133	0,193
		2	0,036	0,042	0,076	0,149	0,134	0,191
		3	0,034	0,043	0,077	0,148	0,133	0,193
	3	1	0,034	0,041	0,076	0,148	0,133	0,192
		2	0,035	0,041	0,076	0,148	0,132	0,191
		3	0,035	0,043	0,076	0,150	0,134	0,191
2	1	1	0,035	0,042	0,075	0,149	0,137	0,192
		2	0,035	0,041	0,075	0,149	0,137	0,191
		3	0,035	0,041	0,073	0,151	0,136	0,193
	2	1	0,034	0,041	0,076	0,149	0,133	0,192
		2	0,036	0,040	0,077	0,148	0,134	0,192
		3	0,035	0,043	0,076	0,148	0,134	0,191
	3	1	0,035	0,042	0,074	0,151	0,134	0,193
		2	0,037	0,042	0,075	0,152	0,134	0,193
		3	0,037	0,041	0,075	0,152	0,136	0,192
̄			0,035	0,042	0,075	0,149	0,134	0,193
σ (AU)			0,00088	0,00087	0,00117	0,00133	0,00147	0,00170
CV (%)			2,4960	2,0842	1,5521	0,8929	1,0972	0,8822

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. Evaluación del parámetro de robustez realizando variaciones en la metodología de trabajo

- Valores de robustez al variar el tiempo de agitación de la grasa o aceite con metanol.

No. Muestra	Tiempo agitación (min)				\bar{A}	σ (AU)	CV (%)
	7	10	15	20			
1	0,035	0,039	0,041	0,042	0,039	0,00274	6,9626
2	0,03	0,033	0,034	0,034	0,033	0,00164	5,0057
3	0,125	0,129	0,133	0,132	0,130	0,00311	2,3988
4	0,090	0,096	0,098	0,099	0,096	0,00344	3,5958
5	0,071	0,073	0,076	0,076	0,074	0,00212	2,8666
6	0,109	0,112	0,114	0,114	0,112	0,00198	1,7644
7	0,062	0,067	0,068	0,068	0,066	0,00243	3,6762
8	0,143	0,146	0,148	0,148	0,146	0,00212	1,4496
9	0,108	0,113	0,113	0,115	0,112	0,00257	2,2875
10	0,068	0,071	0,073	0,072	0,071	0,00196	2,7618

Fuente: elaboración propia.

- Valores de robustez al variar el tiempo de reposo de la muestra para la separación de la fase de extracto de metanol.

No. Muestra	Tiempo reposo separación de fases (min)				\bar{A}	σ (AU)	CV (%)
	5	10	15	20			
1	0,041	0,041	0,041	0,042	0,041	0,00041	0,9877
2	0,035	0,034	0,034	0,034	0,034	0,00043	1,2643
3	0,134	0,133	0,133	0,133	0,133	0,00043	0,3250
4	0,098	0,099	0,098	0,099	0,098	0,00060	0,6047
5	0,075	0,076	0,076	0,076	0,076	0,00043	0,5716
6	0,113	0,112	0,114	0,113	0,113	0,00060	0,5270
7	0,068	0,07	0,068	0,068	0,068	0,00092	1,3509
8	0,147	0,148	0,148	0,149	0,148	0,00072	0,4874
9	0,113	0,113	0,113	0,114	0,113	0,00050	0,4418
10	0,074	0,073	0,073	0,073	0,073	0,00041	0,5567

Fuente: elaboración propia.

Continuación del apéndice 11.

- Valores de robustez al variar el tiempo de reposo del extracto de metanol con dimetilamina 25 %.

No. muestra	Tiempo de reposo solución con DMA (min)				\bar{A}	σ (AU)	CV (%)
	15	20	25	30			
1	0,037	0,041	0,040	0,041	0,040	0,00171	4,2874
2	0,031	0,034	0,034	0,034	0,033	0,00130	3,9069
3	0,128	0,133	0,133	0,133	0,132	0,00217	1,6433
4	0,096	0,098	0,098	0,099	0,098	0,00108	1,1059
5	0,071	0,076	0,075	0,076	0,075	0,00206	2,7672
6	0,11	0,114	0,113	0,115	0,113	0,00183	1,6219
7	0,064	0,068	0,068	0,068	0,067	0,00169	2,5247
8	0,143	0,148	0,147	0,148	0,147	0,00213	1,4505
9	0,111	0,113	0,114	0,113	0,113	0,00108	0,9587
10	0,069	0,073	0,074	0,073	0,072	0,00196	2,7068

Fuente: elaboración propia.

- Valores de robustez al variar volumen de extracto de metanol utilizado para análisis.

No.	Absorbancias por volumen de extracto de metanol (mL)				C_{TBHQ} (ppm) obtenidas según volumen de extracto de metanol (mL)				$\overline{C_{TBHQ}}$	σ (AU)	CV (%)
	5	6	7	8	5	6	7	8			
1	0,007	0,025	0,041	0,058	58,322	59,091	58,81	58,741	58,740	0,27511	0,4683
2	0,001	0,028	0,034	0,05	54,126	60,839	55,14	55,245	56,339	2,63499	4,6771
3	0,07	0,103	0,133	0,163	102,378	104,545	104,60	104,633	104,038	0,95903	0,9218
4	0,042	0,073	0,098	0,123	82,797	87,063	86,95	87,150	85,989	1,84433	2,1448
5	0,029	0,054	0,076	0,098	73,706	75,991	76,12	76,224	75,511	1,04531	1,3843
6	0,056	0,087	0,114	0,141	92,587	95,221	94,94	95,017	94,441	1,07525	1,1385
7	0,021	0,047	0,068	0,088	68,112	71,911	71,96	71,853	70,959	1,64449	2,3175
8	0,083	0,116	0,148	0,18	111,469	112,121	112,25	112,063	111,977	0,30153	0,2693
9	0,056	0,086	0,113	0,14	92,587	94,639	94,44	94,580	94,061	0,85408	0,9080
10	0,027	0,052	0,073	0,095	72,308	74,825	74,79	74,913	74,209	1,09880	1,4807

Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. Programa de calibración de equipos para laboratorio físicoquímico

Equipo	Balanza	Espectrofotómetro	Bureta Digital	Balanza	Bureta Digital
Marca	Swiss Made	Genesys	Brand	Swiss Made	Brand
Modelo	ES 320A	10S UV-VIS	Titrette	ES 320A	Titrette
Serie	4601281	2lsk102202	02G45931	4601281	02G45931
Capacidad	320g	N.A.	50mL	320g	50mL
Fecha de calibración	ene-18	feb-18	dic-17	enero marzo mayo julio	enero marzo mayo julio
Próxima calibración	jun-18	jul-18	may-18	septiembre noviembre	septiembre noviembre
Calibración externa	X	X	X		
Calibración interna				X	X

Fuente: Programa de calibración de equipos, departamento de aseguramiento de calidad de empresa de grasas y aceites vegetales.

Anexo 2. Guía de validación de métodos (OGA-GEC-016)

OGA-GEC-016
2007-01-29/1
Página 2 de 29

Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) Para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo

1 Preámbulo

La utilización de métodos de ensayo, adecuados para el propósito, permite obtener resultados trazables con un nivel apropiado de incertidumbre; dichos resultados comúnmente son usados como base para la toma de decisiones financieras, regulatorias, etc., relacionadas con el desarrollo y fabricación de productos, así como con la prestación de servicios y otras actividades de importancia en las economías nacionales, regionales e internacionales.

Los métodos de ensayo seleccionados, sean éstos normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio, deben estar adecuadamente validados y documentados, previo a su uso. Debe mencionarse que actualmente no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto a la validación de métodos de ensayo; por lo anterior, aunque hay avances, aún no existe acuerdo unánime entre las diferentes disciplinas, respecto a la interpretación de algunos términos relacionados con el proceso de validación y a la aplicación de los mismos.

2 Propósito

El propósito del presente documento es definir una política para la selección y validación de métodos de ensayo a ser aplicada por la OGA en la evaluación de los laboratorios que le soliciten su acreditación, en evaluaciones de seguimiento y re evaluaciones.

Esta política es acorde a lo internacionalmente aceptado, y aplicado a nivel nacional, y por ello facilitará establecer los Acuerdos de Reconocimiento con la Cooperación Internacional para la Acreditación de Laboratorios (ILAC, por sus siglas en inglés), la Cooperación Interamericana de Acreditación (IAAC, por sus siglas en inglés) y otras Cooperaciones Regionales y Organismos Nacionales de Acreditación.

3 Introducción

El reconocimiento formal de la competencia técnica de los laboratorios de ensayo es uno de los principales objetivos de la OGA, con el fin de que los resultados que estos organismos emitan sean aceptados a nivel nacional, regional e internacional.

El contenido de la política tratada en el presente documento es de carácter general y aplica a las distintas disciplinas cubiertas por los laboratorios de ensayo. A modo de ejemplo, en la sección de Fundamentos, Anexo 2 de este documento, se incluyen algunas de las interpretaciones y formas de aplicación de los términos relacionados con la validación y verificación de los métodos de ensayo, usuales en ciertas disciplinas.

Dada la situación internacional descrita en el preámbulo, existen factores fuera del alcance de la OGA que influyen en el desarrollo y la revisión de su política de selección y validación de los métodos de ensayo.

Los requisitos sobre la selección y validación de los métodos de ensayo, que deben cumplir los laboratorios, se exponen en el capítulo 5.4 Métodos de ensayo y calibración y validación

Continuación anexo 2.

de métodos, de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 “Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración”.

4 Política de la OGA sobre la selección y validación de los métodos de ensayo

Es común que para la determinación de cierto analito en un tipo específico de muestra haya varios métodos analíticos disponibles, de orígenes muy variados. Existen muchas entidades nacionales e internacionales que publican métodos para los diferentes campos analíticos (físicos, químicos y biológicos) y sus aplicaciones. El laboratorio usuario de la metodología debe evaluar los diferentes métodos disponibles y seleccionar aquel que mejor se adecue a las necesidades y los recursos del caso.

El método seleccionado debe haber sido validado como parte de su desarrollo. Además, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su adecuación al propósito del análisis, demostrando así el laboratorio usuario que domina el método y lo usa correctamente.

4.1 Selección de los Métodos de Ensayo

- Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados para el propósito, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser normalizados, no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio.
(Ver definiciones en Anexo 1)
- El laboratorio, de común acuerdo con el cliente, puede seleccionar los métodos utilizando su propio criterio o utilizar aquellos métodos normalizados vigentes en el país.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe demostrar que éste corresponde a la última edición, a menos que sea apropiado o posible el uso de una versión anterior del método.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe establecer un sistema para evaluar la factibilidad de implementar los posibles cambios introducidos en las nuevas versiones del método, determinando las diferencias en cuanto a equipo, formación del personal, instalaciones, y demás aspectos necesarios para la ejecución del ensayo.

4.1.1 Métodos Normalizados

Las normas de calidad y regulaciones frecuentemente requieren el uso de métodos normalizados. A la vez, el uso de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que el método será ampliamente utilizado; sin embargo, algunas veces el laboratorio puede contar con un método propio más adecuado para el propósito. Los métodos normalizados deben ser utilizados por el laboratorio exactamente como están descritos.

4.1.2 Métodos No Normalizados

Los métodos no normalizados deben estar apropiadamente validados para poder utilizarlos, ya sean éstos desarrollados por un tercero o resultado de la modificación de un método normalizado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión sobre la calidad de los resultados.

La nota del numeral 5.4.4 de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración, establece que el laboratorio debe desarrollar un procedimiento de ensayo que incluya al menos la siguiente información, previo a la utilización de un nuevo método:

- la identificación apropiada;
- el alcance;
- la descripción del tipo de objeto a ensayar o a calibrar;
- los parámetros o magnitudes a ser determinados y los rangos correspondientes;
- los aparatos y equipos, incluyendo los requisitos de desempeño técnico;
- los patrones de referencia y materiales de referencia requeridos;
- las condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario;
- la descripción del procedimiento, incluyendo:
 - la colocación de marcas de identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación de ítems
 - la verificación a realizar antes de comenzar el trabajo
 - la verificación que el equipo está trabajando apropiadamente y, cuando sea necesario, ajustar y calibrar el equipo antes de cada uso
 - el método de registro de las observaciones y los resultados
 - las medidas de seguridad a observar
- los criterios o requisitos para la aprobación o el rechazo;
- los datos a ser registrados y el método de análisis y presentación;
- la incertidumbre o el procedimiento para estimarla.

Además, la documentación del método debe incluir las especificaciones principales resultantes de la validación.

4.1.3 Métodos Desarrollados por el Laboratorio

- Cuando sea el caso, el laboratorio debe demostrar que tiene un plan en el que se incluye la evaluación de su capacidad en cuanto a personal, equipo y demás recursos que le permitan desarrollar métodos propios.
- Los métodos desarrollados por el laboratorio deben estar adecuadamente validados, documentados y autorizados antes de su uso. Cuando sea posible, se debe emplear material de referencia con una matriz equivalente a la de la muestra, o bien debe utilizarse un método de ensayo normalizado alterno, preferiblemente de diferente principio de medición, para comparar los resultados. Estos métodos deben cumplir al menos los mismos requisitos de documentación indicados en el numeral 4.1.2.

4.2 Validación de los Métodos de Ensayo

En el diseño y desarrollo de métodos, la etapa de validación consiste en el proceso de examinar el método para determinar su conformidad con el uso previsto. La validación normalmente se lleva a cabo sobre la versión final del método desarrollado, bajo condiciones de operación definidas; también puede ser necesario realizarla en etapas previas del proceso de desarrollo. Si existen diferentes usos previstos para el método, se deben llevar a cabo múltiples validaciones. Los parámetros de desempeño que se recomienda incluir en la validación y verificación de diferentes métodos de ensayo pueden ser, según el caso: exactitud, exactitud relativa, desviación, desviación positiva, desviación negativa, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez y fortaleza (*ruggedness*), entre otras.

(Ver definiciones en Anexo 1)

La validación de los métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Esto puede conseguirse utilizando, por ejemplo, muestras comerciales o preparadas en el laboratorio con un nivel conocido de la especie o analito de interés. El analista debe estar consciente que una muestra preparada en la matriz de interés sólo imita parcialmente a una muestra real; no obstante, en muchos casos, ésta es la mejor y la única opción disponible. La extensión de la validación depende del propósito del ensayo y de las propiedades del método analítico en cuestión.

Cuando aplique, la validación de un método debe incluir la estimación de la incertidumbre (ver OGA-GEC-015 Política sobre Incertidumbre de Medición para Laboratorios), y además abarcar factores que determinan la desviación (error sistemático) y la recuperación imperfecta (medición de la recuperación del analito con el que se haya enriquecido la muestra, medición de blancos, estudio de interferencias y efectos de matriz). Esta estimación también debe considerar aspectos como la homogeneidad y estabilidad de la muestra.

Los laboratorios deben conservar los datos sobre la validación de los sistemas de ensayo comerciales (kits) que utilicen, de preferencia remitidos por los fabricantes. Al presentarse el caso de no contar con los datos del fabricante, o no disponer de datos sobre validación generados por otra fuente, o si éstos no son plenamente aplicables, el laboratorio deberá desarrollar un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del sistema de ensayo comercial. Este procedimiento de validación puede incluir ejercicios de intercomparación.

El laboratorio que desarrolla o modifica un método analítico, o la entidad que lo publica, es responsable de su validación, para con ello demostrar que se adecua al propósito para el cual fue diseñado. El laboratorio que implementa un método analítico es responsable de verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación, tanto antes de ponerlo en uso como durante su utilización rutinaria, para demostrar que lo domina y usa correctamente.

A continuación se especifica lo anterior, para el caso de los métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por el laboratorio usuario. (Ver, adicionalmente, las recomendaciones para el procedimiento de validación presentadas en el “Anexo 2. Fundamentos y aplicaciones”).

Continuación anexo 2.

Caso 1 - Método Normalizado:

El laboratorio que va a utilizar un método normalizado debe verificarlo contra sus especificaciones de validación, atendiendo los requisitos para el aseguramiento de la calidad, y no necesita validarlo. Esta verificación permite demostrar que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente (el uso corresponde al propósito para el que fue desarrollado, con respecto a propiedad medida, matriz, rango, equipos utilizados, repetibilidad, etc.).

En la mayoría de los casos se puede considerar que en el desarrollo de los métodos normalizados se han tenido en cuenta todos los aspectos necesarios relativos a la validación. Al presentarse el caso de no haber evidencia suficiente para deducir que se ha llevado a cabo una correcta validación, el laboratorio usuario deberá definir un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del método.

Caso 2 - Método No Normalizado:

El laboratorio que va a modificar un método normalizado debe revalidarlo para demostrar que las especificaciones del método original no se ven afectadas por la modificación introducida. El nivel de revalidación requerido aumenta conforme la magnitud de los cambios realizados. Se consideran cambios menores, por ejemplo, la modificación del tamaño de la muestra y sustitución de reactivos. Se considera cambio mayor, por ejemplo, el cambio de procedimiento o equipo y cambios en el alcance (aplicación a matrices que no se especifican). Para demostrar que una versión modificada de un método cumple las mismas especificaciones que el método original, se deben realizar comparaciones utilizando réplicas. El diseño experimental y el análisis de los resultados deben ser estadísticamente válidos. El laboratorio usuario de un método normalizado modificado debe verificarlo contra sus especificaciones originales, o de revalidación, y así demostrar que domina el ensayo y lo utiliza correctamente.

En el caso de métodos no normalizados, los terceros que los desarrollan son responsables de incluir en dicho proceso la etapa de validación, para demostrar que el método cumple con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación; el laboratorio usuario debe verificar el desempeño del método contra sus especificaciones de validación y así demostrar que domina el ensayo y lo realiza correctamente.

Caso 3 - Método desarrollado por el laboratorio:

El laboratorio que desarrolla y utiliza sus propios métodos debe validarlos, para demostrar que cumplen con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación. Una vez está en uso el método, el laboratorio debe verificar su desempeño contra los parámetros de validación, para demostrar que sigue dominando el ensayo y lo realiza correctamente.

4.3 Revisión de los métodos de ensayo incluidos en el alcance

Para cada sector técnico, la alta dirección debe nombrar a una persona experimentada como responsable de la revisión de los métodos, con el fin de incluir modificaciones,

Continuación anexo 2.

actualizaciones o desarrollar e implementar nuevos métodos. Como parte de la revisión se debe incluir, pero no circunscribirse a, lo indicado a continuación.

- Para confirmar que el método se ajusta al uso previsto en el laboratorio es necesario determinar su desempeño (verificar) conforme una o una combinación de las siguientes técnicas, según lo establecido en la nota 2 del numeral 5.4.5.2 de la Norma COGUANOR NTG/ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración:
 - la calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;
 - la comparación con resultados obtenidos por otros métodos;
 - las comparaciones interlaboratorios (ver Política Ensayos de Aptitud, OGA-GAC-014);
 - la evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;
 - la evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica.
- Aún cuando se haya realizado la validación del método, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se cumplen los parámetros de desempeño documentados por parte de la organización que lo desarrolló, modificó y/o publicó. Para esta verificación el laboratorio puede utilizar, por ejemplo, muestras inoculadas o materiales de referencia incorporados a las matrices más representativas. También tiene que tomar en cuenta los resultados obtenidos de las auditorías internas y externas de sus sistemas de gestión, dejando registro de las verificaciones.
- La documentación de la modificación, actualización, validación y verificación del método debe incluir registros de la determinación de los parámetros de desempeño, limitaciones de su aplicabilidad, procedimientos para control de calidad, calibración y control de documentos. Estos registros deben estar disponibles a solicitud de los miembros del equipo evaluador durante las visitas en sitio, ya sea de evaluación para la acreditación, seguimiento o reevaluación.
- Los procedimientos y responsabilidades para el desarrollo, validación, verificación e implementación de los métodos deben ser descritos en detalle dentro de la documentación del sistema de calidad del laboratorio. Los diagramas de flujo son una herramienta para describir el procedimiento; para métodos complejos también se pueden utilizar programas informáticos de gestión de procesos. El personal responsable debe dejar establecidos los requisitos mínimos de calidad antes de empezar el proceso de validación e implementación del método, o mejor aún establecerlos antes de comenzar todo el proceso de desarrollo.

Para ensayos acreditados, cuando el método es modificado, actualizado o sustituido por uno nuevo, el caso debe ser analizado por la OGA, antes de que se pueda considerar incluido dentro del alcance de la acreditación, según se indica en los documentos OGA-PGE-006, Procedimiento General de Acreditación y OGA-PEC-007, Procedimiento de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración.

Continuación anexo 2.

OGA-GEC-016
2007-01-29/ 1
Página 8 de 29

5 Vigencia y Revisiones

Esta política entrará en vigencia seis meses después de su publicación por parte de la OGA.

La OGA considera que esta política necesitará ser revisada y actualizada, conforme su aplicación y las tendencias internacionales pertinentes.

6 Referencias

APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition. American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation. USA. 1998.

BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM:1993). ISO.

Brown, R., Caphart, M., Faustino, P., Frankewich, R., Gibbs, J., Leutzinger, E., Lunn, G. Ng, L., Rajagopalan, R., Chiu, Y., Sheinin, E. Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of the FDA's Draft Guidance. LCGC Vol. 19, No. 1, 2001.

Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y. C., Zhang, X.M. (Eds.). Analytical Method Validation and Instrumentation Performance Verification. Wiley-Interscience. USA. 2004

CITAC/EURACHEM. Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation. 2002.

COGUANOR. Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración.

COGUANOR. Norma COGUANOR NGR/ISO 9000:2000 Sistemas de Gestión de Calidad-Fundamentos y Vocabulario.

Dux, J. Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. 2 Ed. Chapman & Hall. USA,1990

ENAC. CGA-ENAC-LEC:2001 Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración.

ENAC. G-ENAC-04:2002 Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Web Edition. 1998.

EURACHEM/CITAC. Traceability in Chemical Measurement, A guide to achieving comparable results in chemical measurement. 2003.

Garfield, F. M. Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos. AOAC Internacional. EUA, 1993.

Continuación anexo 2.

OGA-GEC-016
2007-01-29/ 1
Página 9 de 29

ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ILAC. ILAC-G18:2002 The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessments of the Scope in Testing.

ISO. Standard ISO/TR 13843:2000 Water quality – Guidance on Validation of Microbiological Methods.

IUPAC. Compendium on Analytical Nomenclature. Chap 18, QA Processes. Web Edition. 2002

Johnson, J. D., Van Buskirk, G. E. Analytical Method Validation. Journal of Validation Technology. Vol. 2, No. 2, 1996, p 88-105.

Kenkel, J. A Primer on Quality in the Analytical Laboratory. National Science Foundation / Lewis Publishers - CRC Press LLC. USA. 2000.

NCCLS. Approved Guideline Document GP21 A Quality System Model for Health Care. National Committee of Clinical Laboratory Standards (Samaza, K, Ed.). USA. 1999.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. Fundamentals of Analytical Chemistry. 6th. Ed. Saunders College Publishing. USA. 1992.

USP. United States Pharmacopeia 28 and National Formulary 23. United States Pharmacopeial Convention. USA. 2005.

7 Anexos

Anexo 1 Definiciones

Anexo 2 Fundamentos y Aplicaciones

Fuente. Oficina Guatemalteca de Acreditación. *Guía técnica guatemalteca: política de selección y validación de métodos de ensayo.* (OGA-GEC-016). Guatemala, Guatemala: OGA. 2007. 29

p.

Anexo 3. Método oficial (Ce 6-86) de cuantificación de antioxidante

COMMERCIAL FATS AND OIL



Official Method Ce 6-86

Reapproved 2017

Antioxidants, Liquid Chromatographic Method

DEFINITION This method determines propyl gallate (PG), 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), nordihydroguaiaretic acid (NDGA), 2- and 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol (Ionox-100), 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) in oils, under the conditions of the test (see References, 1).

SCOPE Applicable to animal and vegetable fats and oils and shortenings. The antioxidants are dissolved in hexane, partitioned into acetonitrile (which is concentrated and diluted with isopropanol to give a 1:1, v/v, isopropanol-acetonitrile solution) and then separated by reverse-phase gradient elution by HPLC and detected at 280 nm.

Note: It has been reported that crude canola oil can produce false positive results for TBHQ with this method.

APPARATUS

1. Gradient liquid chromatograph—equipped with 10 mv strip chart recorder, 20 μ L sample loop injection valve, and detector to measure absorbance at 280 nm.
2. Typical operating conditions—detector sensitivity, 0.05 AUFS; time constant, 0; temperature, ambient; flow rate, 2 mL/min.
3. HPLC column—stainless steel, 250 mm length, 4.6 mm i.d., packed with 10 μ m LiChrosorb RP-18 (E. Merck, Darmstadt, Germany), or equivalent. Use guard column if desired. Baseline separation of all seven antioxidants should be obtained as shown in Fig. 1.
4. Pyrex™ beakers—50 and 150 mL.¹
5. Separators—125 and 250 mL.¹
6. Volumetric flasks—50 and 100 mL.¹
7. Round-bottomed flasks—250 mL.¹
8. Graduated glass cylinders—with ground-glass stoppers, 10 mL.

REAGENTS (see AOCs Laboratory Safety)

1. Solvents—distilled in glass, HPLC grade: acetonitrile, 2-propanol, and hexane.
2. HPLC mobile phase, HPLC-grade solvents, or equivalent—
 - (a) Distilled H₂O, add 5% acetic acid.
 - (b) Acetonitrile, add 5% acetic acid.
 - (c) Use linear gradient, from 30% (b) in (a) to 100% (b) over 10 min, followed by 4 min hold at 100% (b) at 2 mL/min.
 - (d) For test portion only, increase flow rate to 6 mL/min at 100% (b) for 5 min, or until nonpolar lipids are eluted.
 - (e) For test portions and standards, return to 30% (b) over 1 min at 2 mL/min, and let baseline, pressure, and mobile-phase composition stabilize, requiring about 10 min.
 - (f) Run blank gradient (no injection).
 - (g) Peaks interfering with detection of any antioxidant should not be present. If small peaks that cannot be eliminated are present, all relevant peak heights are to be corrected for interferences.
3. Antioxidants for standards—BHA (mixture of 2- and 3-isomers), BHT, TBHQ, Ionox-100, THBP, and PG (available from Polyscience Corp., Niles, IL, USA); NDGA (Food Chemicals Codex Reference Standard), or equivalent.
4. Standard solutions—Refrigerate all antioxidant solutions out of direct light. Prepare all solutions with 2-propanol + acetonitrile (1:1).
 - (a) Stock solution (1 mg/mL)—Accurately weigh and transfer 50 mg of each antioxidant into one 50 mL volumetric flask, dissolve, dilute to volume and mix.
 - (b) Standard solution (0.01 mg/mL; 10 μ g/mL)—Pipet 1 mL stock solution into a 100 mL volumetric flask, dilute to volume and mix.
5. Extracting solvents—Saturate hexane and acetonitrile by shaking together for 2 min and separate. Unless otherwise specified, use these saturated solvents for the extraction below.

Continuación anexo 3.

COMMERCIAL FATS AND OIL

Ce 6-86 ■ Antioxidants, Liquid Chromatographic Method

PROCEDURE

1. Extraction of liquid oils—
 - (a) Accurately weigh about 20 g oil into a 50 mL beaker and quantitatively transfer to a 100 mL volumetric flask, rinsing the beakers with hexane. Dilute to volume with hexane and mix.
 - (b) Pipet 25 mL aliquot into a 125 mL separator funnel and extract with three 50 mL portions of acetonitrile. If emulsions form, break by holding separator funnel under hot tap water 5–10 sec. Collect extracts in 250 mL separator, and let combined extracts drain slowly into a 250 mL round-bottomed flask to aid removal of hexane-oil droplets.

Note—At this point, the 150 mL acetonitrile extract may be stored overnight under refrigeration.
 - (c) Evaporate acetonitrile extract to 3–4 mL using a flash evaporation with water bath at a temperature of no more than 40°C. Evaporation should be completed in less than 10 min.

Note—Losses of TBHQ may occur if evaporation time is prolonged. Use an efficient vacuum source and ice-water cooling to decrease evaporation time.
 - (d) Using a disposable pipet, transfer acetonitrile-oil droplet mixture to a 10 mL graduate. Rinse flask with small portions of nonsaturated acetonitrile, and transfer rinsings to the graduate with a disposable pipet until 5 mL is collected. Rinse disposable pipet, and continue to rinse flask with small portions of 2-propanol, transferring all rinsings to the graduate until exactly 10 mL is collected. Mix contents of the graduate.

Note—Avoid delays in analysis after preparing the test sample solution because loss of TBHQ may occur.
2. Extraction of lards or shortenings—
 - (a) Accurately weigh 10 g lard or shortening into a 150 mL beaker. Add approximately 30 mL hexane and dissolve sample, heating gently if necessary. Dilute to volume and mix. Pipet 25 mL aliquot into a 125 mL separator.
 - (b) Continue extractions as in Procedure, 1, (b).
3. Chromatography—
 - (a) Using a sample loop injection valve, inject, in duplicate, 20 µL of the prepared sample solutions onto the column, and solvent program as described in Reagents, 2. Inject 20 µL antioxidant standard solution, Reagents, 4, (b), and solvent program as described, before and after each test portion. For test portion peaks off-scale, quantitatively dilute the sample solution with 2-propanol + acetonitrile (1:1).
 - (b) Identify peaks by comparison with retention times of the standard.

Note—Octyl gallate (available from Pfaltz and Bauer, Inc., Stamford, CT, USA), if present, may coelute with IonoX-100, but can be separated with a H₂O-methanol gradient as follows: 30% (c) (methanol with 5% acetic acid) in (a) (H₂O with 5% acetic acid) to 100% (c) over 10 min. If both IonoX-100 and octyl gallate are present, accurate quantitation may not be possible.
 - (c) Carry out reagent blank determination, substituting 25 mL hexane for hexane-oil. Continue extraction as in Procedure, 1, (b). Inject 20 µL reagent blank solution, and solvent program as described. Peaks interfering with determination of any antioxidant should not be present. Using blank gradient chromatogram as a guide to follow baseline, determine average peak height of antioxidant test samples from duplicate injections (corrected for reagent and gradient blanks) and average peak height of antioxidant standard from duplicate injections before and after sample (corrected for gradient blank).

CALCULATIONS

1. Calculate concentrations of antioxidant as follows:

$$\text{Antioxidant, mg/kg} = \frac{R \times C}{R' \times W}$$

Where—

R and R' = peak heights from samples and standard, respectively

C = concentration of standard in µg/mL

W = mass of sample in g/mL in 10 mL final extract

D = dilution factor if solution injection is diluted

METHOD PERFORMANCE

Average recovery (av rec); S_r, repeatability (within-laboratory) standard deviation; S_R, reproducibility (including repeatability) standard deviation are as follows (as noted in References, 3):

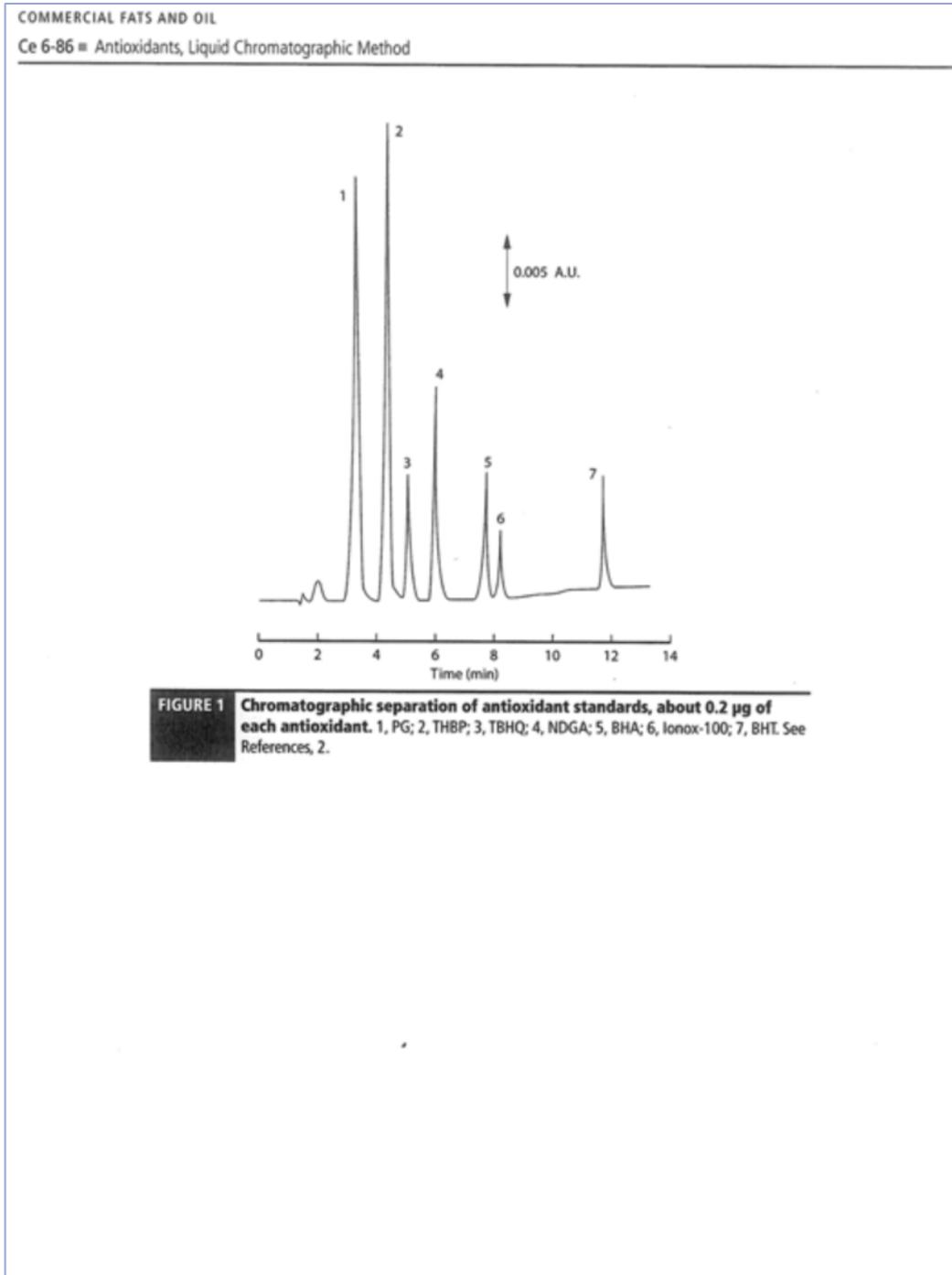
1. Oils—

PG av rec at 19–201 mg/kg = 95%
(S_R = 3.3–7.6, S_r = 2.2–7.6)

Continuación anexo 3.

		COMMERCIAL FATS AND OIL
		Ce 6-86 = Antioxidants, Liquid Chromatographic Method
THBP	av rec at 20–201 mg/kg = 97% ($S_R = 1.3-6.5$, $S_r = 1.0-5.2$)	
TBHQ	av rec at 19–205 mg/kg = 98% ($S_R = 2.5-26.0$, $S_r = 1.5-9.5$)	
NDGA	av rec at 18–98 mg/kg = 97% ($S_R = 0.5-4.9$, $S_r = 0.3-4.7$)	
BHA	av rec at 19–207 mg/kg = 99% ($S_R = 0.7-7.8$, $S_r = 0.4-6.5$)	
Ionox-100	av rec at 20–217 mg/kg = 96% ($S_R = 0.7-14.7$, $S_r = 0.7-12.2$)	
BHT	av rec at 20–210 mg/kg = 84% ($S_R = 0.9-5.2$, $S_r = 0.9-3.5$)	
2. Lard—		
PG	av rec at 37–101 mg/kg = 91% ($S_R = 1.6-4.0$, $S_r = 1.6-3.2$)	
THBP	av rec at 39–105 mg/kg = 92% ($S_R = 1.4-13.8$, $S_r = 1.4-7.2$)	
TBHQ	av rec at 38–102 mg/kg = 92% ($S_R = 11.6-25.0$, $S_r = 6.0-7.7$)	
NDGA	av rec at 36–98 mg/kg = 93% ($S_R = 1.0-5.4$, $S_r = 1.0-2.6$)	
BHA	av rec at 38–103 mg/kg = 97% ($S_R = 1.9-3.9$, $S_r = 1.9-2.5$)	
Ionox-100	av rec at 40–108 mg/kg = 95% ($S_R = 1.8-5.9$, $S_r = 1.2-4.8$)	
BHT	av rec at 39–105 mg/kg = 86% ($S_R = 1.0-5.6$, $S_r = 1.1-3.4$)	
NOTE		
¹ Rinse all glassware with CHCl_3 (see <i>AOCS Laboratory Safety</i>), acetone, and methyl alcohol, in that order, and blow dry with nitrogen.		
REFERENCES		
1. This method was adopted from <i>Official Methods of Analysis</i> , AOAC International, 16th ed., Vol. II, Gaithersburg, MD, 1995, Ch. 47, p. 2, Method 983.15 and <i>Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives</i> , International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th edn., Blackwell Scientific Publications, 1987, IUPAC Method 2.642.		
2. From Page, B. D., <i>J. Assoc. Off. Anal. Chem.</i> 66:729 (1983).		
3. Horwitz, W., <i>Ibid.</i> 67:432 (1984).		
Copyright © 2017 by the AOCS		Page 3 of 4
Refer to the AOCS Laboratory Safety chapter when using this Method.		

Continuación anexo 3.



Fuente. American Oil Chemists Society. "Antioxidants-Liquid Chromatographic Method". AOCS Official Method Ce-6-86. EE.UU., Illinois: AOCS, 2009. 4 p.

