



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE**  
**ANTIOXIDANTE TBHQ EN ACEITES Y MANTECAS**  
**VEGETALES POR CROMATOGRFÍA DE GASES EN**  
**INDUSTRIAS ALES-MANTA**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:**

**JOHANNA CAROLINA BUCAY MARTÍNEZ**

Riobamba – Ecuador

2024



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE**  
**ANTIOXIDANTE TBHQ EN ACEITES Y MANTECAS**  
**VEGETALES POR CROMATOGRFÍA DE GASES EN**  
**INDUSTRIAS ALES-MANTA**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** JOHANNA CAROLINA BUCAY MARTÍNEZ

**DIRECTORA:** ING. CRISTINA ALEJANDRA MUÑOZ SHUGULI

Riobamba – Ecuador

2024

© 2024, Johanna Carolina Bucay Martínez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Johanna Carolina Bucay Martínez, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 10 de mayo de 2024.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above the printed name.

**Johanna Carolina Bucay Martínez**

**131264731-4**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Titulación certifica que: el Trabajo de Titulación; Tipo: Trabajo Experimental, **VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTE TBHQ EN ACEITES Y MANTECAS VEGETALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EN INDUSTRIAS ALES-MANTA**, realizado por la señorita, **JOHANNA CAROLINA BUCAY MARTÍNEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2024-05-10
Ing. Cristina Alejandra Muñoz Shugulí <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2024-05-10
BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basante <b>ASESORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2024-05-10

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis amados padres Fausto y Elisa junto a mi hermano Jonathan, quienes han sido mi mayor inspiración, motivación y soporte a lo largo de este camino a pesar de la distancia. A mis queridos tíos que me han recibido con los brazos abiertos en sus hogares apoyándome fielmente en mi proceso de formación académica. A mis amigos, por su aliento incondicional, comprensión y complicidad a lo largo de esta travesía académica y por estar a mi lado en las buenas y en las malas.

Johanna

## **AGRADECIMIENTO**

El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica por permitirme obtener una profesión. A todos los docentes con los que he compartido durante todo este proceso académico compartiendo sus conocimientos y experiencias para mi formación profesional. A mis amigos como Geomar por su apoyo inquebrantable y estar presente en este importante camino de mi vida académica. Agradecer de todo corazón a mis padres, hermano, tíos y primos por su amor, paciencia y aliento constante, siendo su apoyo fundamental para cumplir esta meta tan importante en mi vida, Además, quisiera agradecer a la Ing. Cristina Muñoz, mi tutora de tesis, por su guía durante el proceso de la realización de este trabajo.

Johanna

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

<b>1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA</b> .....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. <i>Objetivo general</i> .....	4
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	4

### CAPÍTULO II

<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
2.1. Aceites y grasas.....	5
2.1.1. <i>Oxidación de las grasas comestibles</i> .....	5
2.2. Antioxidantes.....	6
2.2.1. <i>Antioxidantes sintéticos</i> .....	6
2.2.1.1. <i>Terbutilhidroquinona (TBHQ)</i> .....	7
2.2.2. <i>Antioxidantes naturales</i> .....	7
2.3. Certificación FSSC 22000.....	7
2.4. Cromatografía de gases.....	8
2.4.1. <i>Cromatografía Gas-Sólido</i> .....	8
2.4.2. <i>Cromatografía Gas-Líquido</i> .....	8
2.5. Componentes del cromatógrafo.....	9
2.5.1. <i>Columnas cromatográficas</i> .....	9
2.5.1.1. <i>Columna capilar</i> .....	9
2.5.2. <i>Sistemas de detección</i> .....	9
2.5.2.1. <i>Detector de ionización por llama</i> .....	9

2.5.3.	<i>Generador de hidrógeno</i> .....	10
2.5.4.	<i>Aire sintético</i> .....	10
2.5.5.	<i>Helio</i> .....	11
2.5.6.	<i>Automuestreador y autoinyector</i> .....	11
2.6.	<b>Validación de método analítico</b> .....	11
2.6.1.	<i>Linealidad</i> .....	11
2.6.2.	<i>Sensibilidad</i> .....	12
2.6.3.	<i>Selectividad</i> .....	12
2.6.4.	<i>Límite de detección</i> .....	12
2.6.5.	<i>Límite de cuantificación</i> .....	13
2.6.6.	<i>Precisión y Repetibilidad</i> .....	13
2.6.7.	<i>Reproducibilidad</i> .....	13
2.6.8.	<i>Exactitud</i> .....	14
2.6.9.	<i>Robustez</i> .....	14

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	15
3.1.	<b>Enfoque, diseño y alcance</b> .....	15
3.2.	<b>Diseño experimental</b> .....	15
3.2.1.	<i>Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo</i> .....	15
3.2.2.	<i>Criterios de inclusión</i> .....	15
3.2.3.	<i>Criterios de exclusión</i> .....	15
3.2.4.	<i>Identificación de variables</i> .....	15
3.2.4.1.	<i>Variable dependiente</i> .....	16
3.2.4.2.	<i>Variable independiente</i> .....	16
3.3.	<b>Métodos, técnicas e instrumentos de investigación</b> .....	16
3.3.1.	<i>Equipos</i> .....	16
3.3.2.	<i>Materiales y Reactivos</i> .....	16
3.3.3.	<i>Condiciones cromatográficas</i> .....	17
3.3.4.	<i>Preparación de muestras</i> .....	17
3.3.5.	<i>Extracción del antioxidante</i> .....	18
3.3.6.	<i>Validación del método de análisis</i> .....	18
3.3.6.1.	<i>Linealidad</i> .....	18
3.3.6.2.	<i>Sensibilidad</i> .....	19
3.3.6.3.	<i>Selectividad</i> .....	19
3.3.6.4.	<i>Límite de detección y límite de cuantificación</i> .....	19

3.3.6.5.	<i>Precisión</i> .....	20
3.3.6.6.	<i>Exactitud</i> .....	20
3.3.6.7.	<i>Robustez</i> .....	21
3.3.6.8.	<i>Verificación interlaboratorio</i> .....	21

## CAPÍTULO IV

4.	<b>ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	22
4.1.	<b>Condiciones cromatográficas</b> .....	22
4.2.	<b>Parámetros de validación</b> .....	23
4.2.1.	<i>Linealidad y sensibilidad del método</i> .....	23
4.2.2.	<i>Selectividad del método</i> .....	24
4.2.3.	<i>Límite de Detección y Cuantificación del método</i> .....	25
4.2.4.	<i>Precisión del método en aceites y mantecas vegetales</i> .....	26
4.2.4.1.	<i>Repetibilidad</i> .....	26
4.2.4.2.	<i>Precisión intermedia</i> .....	27
4.2.5.	<i>Exactitud del método en aceites y mantecas vegetales</i> .....	29
4.2.6.	<i>Robustez del método en aceite y manteca vegetal</i> .....	30
4.2.7.	<i>Verificación interlaboratorio</i> .....	31

## CAPÍTULO V

5.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	33
5.1.	<b>Conclusiones</b> .....	33
5.2.	<b>Recomendaciones</b> .....	33

## BIBLIOGRAFÍA

## ANEXOS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3-1.</b> Condiciones cromatográficas anteriores.....	17
<b>Tabla 4-1.</b> Nuevas condiciones cromatográficas.....	22
<b>Tabla 4-2.</b> Resultados de la linealidad del método.....	24
<b>Tabla 4-3.</b> Resultados para la determinación del LD y LQ.....	26
<b>Tabla 4-4.</b> Resultados para repetibilidad en manteca vegetal.....	26
<b>Tabla 4-5.</b> Resultados para repetibilidad en aceite vegetal.....	27
<b>Tabla 4-6.</b> Resultados para precisión intermedia en manteca vegetal.....	28
<b>Tabla 4-7.</b> Resultados para precisión intermedia en aceite vegetal.....	28
<b>Tabla 4-8.</b> Resultados para exactitud en manteca vegetal.....	29
<b>Tabla 4-9.</b> Resultados para exactitud en aceite vegetal.....	30
<b>Tabla 4-10.</b> Resultados para robustez en manteca vegetal.....	31
<b>Tabla 4-11.</b> Resultados para robustez en aceite vegetal.....	31
<b>Tabla 4-12.</b> Resultados para la verificación del método.....	32

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 4-1.</b> Cromatograma con las condiciones cromatográficas anteriores .....	22
<b>Ilustración 4-2.</b> Cromatograma con las nuevas condiciones cromatográficas .....	23
<b>Ilustración 4-3.</b> Curva de calibración para TBHQ.....	24
<b>Ilustración 4-4.</b> Cromatograma del analito con contaminante (BHT) .....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECONOCIMIENTO Y REUBICACIÓN DEL AUTOMUESTREADOR DEL CROMATÓGRAFO DE GASES
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ACEITE Y MANTECA VEGETAL
- ANEXO C:** ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ANTIOXIDANTE
- ANEXO D:** TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ACEITE Y MANTECA VEGETAL
- ANEXO E:** TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS POR ANALISTA DE INDUSTRIAS ALES
- ANEXO F:** CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES
- ANEXO G:** ESTUDIO DE NORMALIDAD PARA ANÁLISIS ANOVA EN ACEITE Y MANTECA VEGETAL
- ANEXO H:** IDENTIFICACIÓN DE ESTÁNDARES PARA ENVÍO A LABORATORIO EXTERNO
- ANEXO I:** RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE TBHQ POR PARTE DE EUROFINS
- ANEXO J:** RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE TBHQ POR PARTE DE INDUSTRIAS ALES
- ANEXO K:** NORMA INTERNA DEL MÉTODO VALIDADO IMPLEMENTADO EN INDUSTRIAS ALES

## RESUMEN

Industrias Ales utiliza terbutilhidroquinona (TBHQ) como antioxidante alimentario, cuya concentración máxima (200 ppm) es regulada con el fin de garantizar la calidad y seguridad de los productos. Sin embargo, la industria referida actualmente no cuenta con un método validado para la cuantificación y control de la dosificación del antioxidante. En este sentido, el objetivo del presente trabajo experimental fue validar un método de cuantificación de antioxidante TBHQ en aceites y mantecas vegetales por cromatografía de gases en Industrias Ales-Manta. Inicialmente, se establecieron los requerimientos de tratamiento de la muestra y las condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación del antioxidante. Para la validación del método, se prepararon muestras de aceite de oleína de palma y manteca vegetal con diferente concentración de TBHQ, de las cuales posteriormente se extrajo el antioxidante y se cuantificó mediante el método cromatográfico antes establecido. Así, se determinaron los parámetros: linealidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación, exactitud, precisión y robustez, considerando como criterio de éxito los valores del coeficiente de variación (CV) y porcentaje de recuperación del compuesto. Además, se verificó la repetibilidad y precisión intermedia del método a través de análisis estadísticos de comparación de muestras. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Respecto a los parámetros de validación, se obtuvieron CV menores a 2 % y de 90 al 100% de recuperación de TBHQ, lo que demostró éxito en todos los parámetros establecidos. Adicionalmente, no se evidenciaron diferencias significativas entre datos, lo que reveló una alta repetibilidad y precisión en el método. Finalmente, estos resultados presentaron similitud estadística con los obtenidos en un laboratorio externo acreditado. De esta forma, se concluye que las condiciones de tratamiento de la muestra, así como el método cromatográfico implementado en Industrias Ales – Manta son válidos para la cuantificación del antioxidante TBHQ en aceites y mantecas vegetales.

**Palabras clave:** <VALIDACIÓN ANALÍTICA>, <TERBUTILHIDROQUINONA (TBHQ)>, <CROMATOGRAFÍA DE GASES>, <MÉTODO ANALÍTICO>, <ACEITE VEGETAL>, <MANTECA VEGETAL>, <INDUSTRIAS ALES>, <MANTA (CANTÓN)>.



0834-DBRA-UPT-2024

## SUMMARY

The main objective of this research study was to validate a method for quantification of TBHQ antioxidant in vegetable oils and shortenings by gas chromatography Ales Industries Manta, Ecuador. Ales Industries uses Tert-butyl hydroquinone (TBHQ) as a food antioxidant, whose maximum concentration (200 ppm) is regulated in order to guarantee product quality and safety. However, this industry does not currently have a validated method for quantifying and controlling the dosage of the antioxidant. Initially, the sample treatment requirements and chromatographic conditions for the identification and quantification of the antioxidant were established. For the validation of the method, palm olein oil and vegetable shortening samples were prepared with different TBHQ concentrations, from which the antioxidant was subsequently extracted and quantified by the chromatographic method established above. Thus, the following parameters were determined: linearity, sensitivity, selectivity, limits of detection and quantification, accuracy, precision and robustness, considering as success criteria the values of the coefficient of variation (CV) and percentage recovery of the compound. The repeatability and intermediate precision of the method were verified through statistical analysis of sample comparison. All analyses were performed in triplicate. Regarding the validation parameters, CVs of less than 2 % and from 90 to 100% recovery of TBHQ were obtained, which demonstrated success in all the established parameters. Additionally, no significant differences between data were evidenced, which revealed a high repeatability and precision in the method. Finally, these results showed statistical similarity with those obtained in an external accredited laboratory. Thus, it is concluded that the sample treatment conditions, as well as the chromatographic method implemented at Ales Industries - Manta are valid for the quantification of the antioxidant TBHQ in vegetable oils and shortenings.

**Keywords:** <ANALYTICAL VALIDATION>, <TERT-BUTYLHYDROQUINONE (TBHQ)>, <GAS CHROMATOGRAPHY>, <ANALYTICAL METHOD>, <VEGETAL OIL>, <VEGETAL BUTTER>, <INDUSTRIAS ALES>, <MANTA (CANTON)>

0834-DBRA-UPT-2024



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

## INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son aditivos alimentarios capaces de prevenir los efectos nocivos provocados por el proceso de oxidación y sus radicales libres, clasificándose en naturales o sintéticos. Los antioxidantes naturales se obtienen principalmente de frutas y verduras, sin embargo, debido a las dificultades en el proceso de extracción y su poca estabilidad, este tipo de antioxidantes no son suficientes para satisfacer las necesidades de las industrias alimentarias, caso contrario a los de tipo sintético que son utilizados ampliamente, resaltando los antioxidantes fenólicos como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (PG) y terbutilhidroquinona (TBHQ) (Xu et al., 2021, p.1).

La terbutilhidroquinona (TBHQ) es uno de los antioxidantes más comunes y utilizados en aceites comestibles y en alimentos oleaginosos para retrasar la rancidez oxidativa del aceite prolongando su vida útil, sin embargo, según estudios toxicológicos, en altas concentraciones el TBHQ puede generar daño en el ADN. Por lo tanto, gobiernos como el de China, Estados Unidos y Australia regulan su uso como aditivo alimentario, siendo importante para la seguridad alimentaria detectar el contenido original de TBHQ dosificado en los aceites comestibles (Liu et al., 2022).

Debido a esta necesidad en la regularización del TBHQ, se ha buscado plantear diversos métodos analíticos para su determinación tales como el análisis electroquímico, la cromatografía de gases acoplado con espectrofotometría de masas, sensor fluorescente, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC), entre otros, siendo el del RP-HPLC el método más común para la determinación de antioxidantes fenólicos de acuerdo a la AOCS (Liu et al., 2022), no obstante, cada laboratorio opta por el método que tenga a su disposición.

En el presente trabajo experimental se pretende validar un método de cuantificación de antioxidante TBHQ en base a los parámetros de linealidad, sensibilidad, selectividad, límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión y robustez por medio de cromatografía de gases. Este trabajo se realizará en el laboratorio interno de la Industrias Ales, ubicada en el cantón de Manta de la provincia de Manabí, con el fin de garantizar la dosificación del antioxidante en planta en productos tales como mantecas y aceites vegetales, para dar cumplimiento a los requisitos del Codex Alimentarius para aditivos alimentarios.

# CAPÍTULO I

## 1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

### 1.1. Planteamiento del problema

En Ecuador, la industria de aceites y grasas vegetales está en constante desarrollo, siendo su producción representativa en un 4% del PIB agrícola con un crecimiento anual del 8%, ubicándose como el séptimo producto agrícola de exportación del país, según el MPCEIP. Su alta producción responde a la alta demanda del producto por parte de la población ecuatoriana; según ANCUPA, el consumo de aceites y grasas vegetales en el país es de 240.000 toneladas al año (Sánchez et al., 2019, pp. 1-3). Sin embargo, para el 2022 el consumo de aceite vegetal cayó un 4% en el país debido a la inflación en el precio de los productos; con el aceite más caro, los ecuatorianos moderaron su consumo, buscando presentaciones más baratas o cambiaron a otro sustituto como la manteca vegetal (Coba, 2022).

Dentro de las distintas industrias productoras de aceites y mantecas vegetales del país se encuentra Industrias Ales, la cual tiene su planta productora en Manta, quienes dentro de la formulación de sus productos utilizan antioxidantes como el TBHQ, compuesto altamente utilizado en las industrias de alimentos productoras de aceites y mantecas vegetales por su gran eficacia para evitar la oxidación de las grasas prolongando así su vida útil (Badui, 2012, p. 254). Según distintos estudios *in vivo*, altas concentraciones de este antioxidante puede resultar perjudicial para la salud, por lo que el Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JEFSA) y el CODEX Alimentarius han establecido un límite máximo de uso según el tipo de alimento (Khezerlou et al., 2022, p. 1067).

Así, según el Codex Alimentarius (2019, pp. 285), en el caso de los aceites y mantecas vegetales, se ha establecido un máximo de 200 ppm del antioxidante terbutilhidroquinona (TBHQ), a lo que se deben regir, al igual que otras empresas de Centroamérica o de la Unión Europea, las cuales también incorporan TBHQ en alguno de sus productos, pero bajo un riguroso control siguiendo y cumpliendo la normativa vigente en base a lo establecido en el Codex Alimentarius (RTCA, 2012, p. 212) (Comisión Europea, 2011, p. 46).

Industrias Ales, con el fin de garantizar el bienestar de sus consumidores, tiene la certificación FSSC 22000 de Inocuidad Alimentaria, en donde establece como punto crítico de control la dosificación del antioxidante. En este sentido, uno de los requisitos es contar con un método validado de cuantificación de TBHQ para el control de la dosificación y el cumplimiento de la

normativa, sin embargo, al no tener validado su método, se pone en duda la precisión y la exactitud de los resultados afectando su confiabilidad. Por tanto, de no cumplirse lo establecido, en la próxima auditoría por parte del ente certificador podría retirar la certificación, situación que involucraría pérdida de negocios con algunos de sus clientes además de perder la oportunidad de entablar negociaciones con nuevos clientes que se rigen bajo esta normativa (ISOTools, 2020), además de verse comprometida la salud de los consumidores en caso de superarse los límites máximos establecidos sin un control de la cuantificación adecuada ya que, de acuerdo a estudios en animales de experimentación, se ha evidenciado efectos mutagénicos y carcinogénicos (Carbajal et al., 2021, p. 4).

## **1.2. Justificación**

Industrias Ales, como organismo que trabaja con el propósito de cuidar a las familias ecuatorianas con la calidad de sus productos, ha buscado adquirir varias certificaciones que avalan las buenas prácticas de calidad e inocuidad con las que cuenta la empresa tales como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Certificación Kosher, ISO 9001:2015, BASC y, la más reciente, la FSSC 22000 (Industrias Ales, 2021). En esta última normativa, si bien no es obligatoria su implementación en toda empresa, puede conllevar beneficios tal como el entablar conexiones con nuevos clientes, siempre y cuando se cumpla con las revisiones, actualizaciones y auditorías realizadas por el ente certificador (ISOTools, 2020).

Para esta normativa, Industrias Ales estableció como uno de sus puntos críticos de control (PCC) en la línea de producción de los aceites y mantecas de origen vegetal la dosificación del antioxidante terbutilhidroquinona (TBHQ), por lo que en su laboratorio interno se realiza la cuantificación del mismo, sin embargo, se requiere su validación. La validación de cualquier método analítico es de suma importancia ya que éste asegura que el método utilizado sea confiable, preciso y que brinde resultados consistentes y de calidad, permitiendo así el cumplimiento de las normas y/o regulaciones a las que se rige el organismo certificador (Uribe, López & Ramos, 2014, p. 12).

El método de cuantificación de antioxidante TBHQ en aceites y mantecas vegetales por cromatografía gaseosa no validado no permite contar con exactitud, precisión y confiabilidad de resultados, lo que en consecuencia implica la toma de decisiones inadecuadas o erróneas. En caso de decisiones críticas, incluso pueden presentarse incumplimientos legales y sanciones, además que la falta de reproducibilidad y robustez del método puede comprometer la estabilidad del método a lo largo del tiempo (Hernández, Macias & Gómez, 2019, p. 2).

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Validar el método de cuantificación de antioxidante TBHQ en aceites y mantecas vegetales por cromatografía de gases en Industrias Ales-Manta.

#### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Determinar las condiciones requeridas para la preparación previa de las muestras a través de revisión bibliográfica.
- Establecer las condiciones adecuadas para la identificación y cuantificación de antioxidantes por cromatografía de gases por medio de bibliografía y ensayos experimentales.
- Comprobar la validez del método para la cuantificación de TBHQ en aceite de oleína de palma mediante una prueba interlaboratorio.

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Aceites y grasas

De acuerdo a la norma INEN 1313: 2015, una manteca vegetal se define como un “producto graso refinado, semisólido constituido por una grasa comestible o una mezcla de aceites y grasas comestibles provenientes de una o más especies vegetales que han sido sometidos a procesos de modificación permitidos”, mientras que un aceite vegetal es un compuesto orgánico obtenido a partir de semillas u otras partes de las plantas, compuesto por ácidos grasos de diferentes tipos; la proporción de estos ácidos grasos y sus diferentes características, son las que dan las propiedades a los distintos aceites vegetales existentes (Domínguez et al., 2019, p. 2).

Los aceites y las grasas son un componente importante de la dieta humana y representa aproximadamente un tercio de la ingesta calórica normal, además de que funcionan como portadores de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y proporcionan energía y ácidos linoleicos esenciales que son responsables del crecimiento, principalmente los aceites (Royo, 2017, pp. 47-48).

##### 2.1.1. *Oxidación de las grasas comestibles*

Toda grasa se oxida con el tiempo, y la rapidez de este depende de factores inherentes como el perfil de ácidos grasos (número de insaturaciones presentes en el ácido graso), el porcentaje de humedad y otras impurezas presentes en la matriz, además de factores externos como la temperatura de almacenamiento, la presencia de luz y de oxígeno. La oxidación de grasas puede causar problemas directos en la calidad del producto y a su vida útil ya que las grasas insaturadas se oxidan mediante un proceso de autooxidación formando radicales libres, una reacción en cadena catalizado por los mismos productos de la reacción (Syed, 2016, pp. 187-190).

Juncos et al. (2021, p. 53) indica que el proceso de autooxidación se puede explicar simplifcadamente en tres pasos: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de la iniciación se da la producción de los primeros radicales que se genera por la acción de promotores como altas temperaturas, iones metálicos, exposición a la luz, oxígeno, etc., de manera que se da la extracción de un hidrógeno al ácido graso quedando con un electrón desapareado, siendo más reactivos, dando continuidad a la reacción en cadena.

En la etapa de propagación, los radicales formados en la etapa anterior captan electrones de otras

moléculas en busca de estabilizarse electroquímicamente por lo que, en consecuencia, es una constante producción de radicales libres, seguido posteriormente por dos reacciones: se producen radicales peroxi al interaccionar el radical con el oxígeno, que seguido reaccionará con otra molécula formando hidroperóxidos y un nuevo radical continuando la propagación hasta tener una alta concentración de radicales libres; en este punto comenzarán a reaccionar entre sí para formar moléculas más estables extinguiéndose los radicales dándose la etapa de terminación (Juncos et al., 2021, pp. 53-54).

Syed (2016, pp. 192-193) explica que los hidroperóxidos, compuestos de característica inodora e insípida que se producen en la etapa de propagación, en primera instancia no afectan a la calidad sensorial del producto, sin embargo, al ser estos inestables, son predecesores de productos de oxidación secundarios como cetonas, aldehídos, alcoholes, hidrocarburos, etc., siendo los que generan cambios físicos tal como aumento de la viscosidad de la grasa comestible, cambios en su composición y alterando su calidad sensorial.

## **2.2. Antioxidantes**

Según Jamanca y Alfaro (2017, p. 1), un antioxidante es cualquier sustancia que se adiciona a distintos tipos de alimentos con el fin de prevenir o retardar la oxidación, esto gracias a una estructura química adecuada para su posterior interacción con los radicales libres del medio, cediéndoles uno o más de sus electrones, inactivando su reactividad con el propósito de prevenir los efectos adversos de estos sobre las funciones biológicas, conservar las características organolépticas y alargar el tiempo de consumo del alimento.

Los antioxidantes pueden clasificarse según su naturaleza y su solubilidad. De acuerdo a la naturaleza, se subdividen en antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos mientras que, según su solubilidad, están los hidrofílicos como son los carotenos y el ácido ascórbico, y los hidrófobos o liposolubles tales como es la vitamina E (Jamanca & Alfaro, 2017, p. 1).

### **2.2.1. Antioxidantes sintéticos**

Los antioxidantes sintéticos o artificiales son compuestos producidos por síntesis química, a los que se les designa una codificación para su empleo principalmente en la industria de los alimentos. Generalmente, en aquellas industrias de alimentos procesados y ultra procesados utilizan antioxidantes de tipo sintético como el BHA (isómeros 2-terc-butil-4-hidroxianisol y 3-terc-butil-4-hidroxianisol), el BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) y el TBHQ (terbutilhidroquinona), siendo estos dos últimos usados en la industria de aceites y mantecas vegetales (Carbajal et al., 2021,

pp. 12-13).

Estos tipos de antioxidantes se caracterizan al tener por lo menos un grupo tiol, amino o hidroxilo unido a un analito bencénico con el fin de cumplir su finalidad de prevenir la oxidación donando protones a los radicales que se puedan formar y estabilizándolos, sin embargo, una vez la grasa haya empezado un proceso de autooxidación, estos antioxidantes sintéticos no son capaces de revertir los efectos producidos (cambios organolépticos) (Juncos et al., 2021, p. 54).

#### *2.2.1.1. Terbutilhidroquinona (TBHQ)*

La terbutilhidroquinona es una sustancia química fenólica cuya fórmula molecular es  $C_{10}H_{14}O_2$ , el cual presenta una apariencia de un polvo cristalino, generalmente de color blanco, con un olor característico; este es prácticamente insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos como son los alcoholes, tal como el metanol, con un punto de fusión de  $127^{\circ}C$  (CFS, 2023).

Se lo utiliza como antioxidante para algunos alimentos, entre esos grasas y aceites, ya que no añade olor, sabor o color. Es indicado para aquellos productos que presentan un bajo contenido de agua, además de ser estable a pH inferior a 7 y resistente a las altas temperaturas, con el fin de extender la vida útil y prevenir la oxidación de las grasas, el cual puede alterar el sabor, color y valor nutrimental del alimento (Guerrero, 2005, p.11).

#### *2.2.2. Antioxidantes naturales*

Los antioxidantes naturales son aquellos compuestos que se encuentran de manera natural en los alimentos, principalmente de origen vegetal, o bien de compuestos derivados de otros organismos vivos (origen microbiológico) con potencial de inhibir los procesos de oxidación (Ibarra 2022, pp. 1-2). Según Zula y Ibarra (2022, pp. 1-2), en la industria alimenticia cárnica se presenta una mayor demanda de antioxidantes naturales como aditivo alimentario, entre los que se maneja están las vitaminas C y E, provitamina A, carotenos, carotenoides, etc. Algunos antioxidantes naturales son los minerales como el selenio, el zinc y el cobre, compuestos fenólicos como los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, y vitaminas como la vitamina A, C y E (Jamanca & Alfaro, 2017, p. 3).

### **2.3. Certificación FSSC 22000**

La FSSC 22000 es un sistema de certificación de seguridad alimentaria basado en la ISO 22000 complementada con normas como la ISO TS 22002-1 y la ISO TS 22002-4, normas para la fabricación de alimentos y de envases respectivamente. Cuando un organismo ya cuenta con la

certificación ISO 22000, para la obtención de la FSSC 22000, únicamente requiere de una revisión adicional con los requisitos adicionales de la FSSC a cumplir, donde uno de dichos requisitos está relacionado con el sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) (ICONTEC, 2022).

Este sistema de certificación está dirigido específicamente al sector de fabricación, al igual que a sectores de almacenamiento y distribución, restauración y venta al por menor y mayor de los productos alimenticios elaborados por organizaciones que fabrican productos de origen animal, productos vegetales perecederos, productos de larga vida útil, entre otros, con el fin de garantizar un sólido sistema de seguridad alimentaria para controlar y minimizar posibles riesgos al igual que garantizar la producción de alimentos seguros (DNV, 2020, pp. 1-2).

## **2.4. Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica analítica utilizada para la separación y cuantificación de componentes o compuestos químicos de una muestra vaporada previo a su inyección a la cabeza de la columna, los cuales son arrastrados por una fase gaseosa y se reparten por una fase estacionaria contenida en una columna cromatográfica hasta su detección por el detector seleccionado. La elución o separación de los componentes de la muestra depende de condiciones como el flujo de la fase móvil, el cual consiste en un gas inerte, el tipo de columna y la temperatura del horno (Linde, 2011).

### **2.4.1. Cromatografía Gas-Sólido**

En la cromatografía gas – sólido, la retención de los analitos de la muestra a analizar se da en una fase estacionaria sólida mediante adsorción. Su aplicación es limitada a comparación de la cromatografía gas – líquido, concentrándose en la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular, debido a que los picos obtenidos suelen presentar colas muy notables, esto como resultado por la naturaleza no lineal del proceso de absorción (Skoog, Crouch & Holler, 2008, pp. 788-810).

### **2.4.2. Cromatografía Gas-Líquido**

Este tipo de cromatografía gaseosa es de gran aplicación en varios campos de la ciencia, por lo que generalmente se lo suele denominar de manera abreviada como “cromatografía de gases”, el cual se caracteriza por la división del o los analitos de una muestra entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada en la superficie de un relleno sólido inerte o en las paredes de un

tubo capilar (Skoog, Crouch & Holler, 2008, pp. 788-810).

## **2.5. Componentes del cromatógrafo**

Un cromatógrafo de gases está compuesto principalmente por un sistema de inyección, por un horno con su columna cromatográfica, un sistema de detección como el detector de captura electrónica (ECD) detector de nitrógeno/fósforo (NPD), detector de ionización de llama (FID) entre otros, y por un sistema de gases (hidrógeno, helio, argón, aire sintético, etc.) (Linde, 2011). A continuación, se describen los componentes del cromatógrafo disponibles en el laboratorio interno de Industrias Ales.

### **2.5.1. Columnas cromatográficas**

En la cromatografía de gases se suele manejar dos tipos de columnas, las empacadas y las capilares, pero actualmente, en la mayoría de aplicaciones, se están empleando las columnas capilares por su alta efectividad y velocidad de elución (Skoog, Crouch & Holler, 2008, pp. 788-810).

#### **2.5.1.1. Columna capilar**

Las columnas capilares pueden medir desde 10 m hasta los 100m y suelen estar constituidas por sílice fundida, con acero inoxidable, vidrio o teflón con el objetivo de que soporte las altas temperaturas a la que se le somete en el horno durante el tiempo de elución (Skoog, Crouch & Holler, 2008, pp. 788-810).

La columna capilar TG-5MS para cromatografía de gases contienen una fase de baja polaridad conformada por 5% de difenil y 95% de dimetilpolisiloxano, además de un sangrado bajo para una relación señal-ruido, sensibilidad e integridad al detector óptimas. Asimismo, estas tienen diferentes especificaciones respecto al diámetro y longitud, del cual se va a utilizar con diámetro externo e interno de 0,25 mm, con espesor de la película de 0,25  $\mu\text{m}$ , una longitud de 15m y temperatura máxima de 330/350°C. Este tipo de columna es recomendada para el análisis de compuestos semivolátiles, fenoles, aminas, disolventes residuales e impurezas de disolventes, drogas, pesticidas, mezclas de bifenilos policlorados (BPCs), entre otros (Fisher Scientific S.L., 2019).

### **2.5.2. Sistemas de detección**

#### **2.5.2.1. Detector de ionización por llama**

El detector de ionización por llama, abreviado como FID, es uno de los detectores más utilizados debido a sus características favorables como lo son sus bajos límites de detección, la confiabilidad y aseguibilidad de los resultados y su amplio rango dinámico de detección, lo que permite determinar cuántos componentes y en qué proporción se encuentran en una muestra determinada (Feng et al., 2019, pp. 219-265).

En un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización por llama (CG-FID), el efluente de la columna se dirige a una llama de hidrógeno y aire el cual piroliza al soluto liberando iones, los mismos que serán recogidos en electrodos creando una corriente, que es directamente proporcional a la cantidad de compuesto quemado, en el circuito del detector convirtiéndose en una señal receptado por un electrómetro. El detector es sensible a la masa más no la concentración, por lo que responde a la cantidad de átomos de carbono que entran al detector por unidad de tiempo (Feng et al., 2019, pp. 219-265).

Este detector presenta ventajas como la insensibilidad a gases nobles, la elevada sensibilidad a compuestos orgánicos y un bajo ruido, y desventajas tales como la destrucción de la muestra durante el paso de la combustión y la necesidad de gases adicionales y controladores (Skoog, Crouch & Holler, 2008, pp. 788-810).

### **2.5.3. Generador de hidrógeno**

Un generador de hidrógeno es un equipo que produce un flujo continuo de hidrógeno de alta pureza a partir de agua desionizada y electricidad por proceso de hidrólisis. Respecto a la marca *PARKER*, sus generadores producen hidrógeno de alta pureza (99.9999%) dado que consta con un módulo purificador encargado de eliminar el oxígeno; adecuado para las aplicaciones de detectores de combustión ya que el hidrógeno, junto al aire sintético, son los componentes principales para la llama del detector y, en ciertas ocasiones, tiene funcionalidad como gas portador o fase móvil (Parker Hannifin Corporation, 2020).

### **2.5.4. Aire sintético**

El aire sintético es una mezcla gaseosa que se elabora a partir de oxígeno y nitrógeno de alta pureza en una proporción del 20% y 80% respectivamente, de característica incolora, inodora, no tóxico ni inflamable. Se usa el aire sintético como un agente oxidante para la llama de los detectores de ionización de llama (FID) acoplados a cromatógrafos gaseosos, como gas comburente para la fotometría de llama y absorción atómica, como gas cero en calibración de instrumentos, entre otros usos (Linde, 2020).

### **2.5.5. Helio**

El helio es uno de los gases portadores más comúnmente utilizados en la cromatografía de gases cuya única función es la de transportar el analito de interés a través de la columna y su fase estacionaria, seleccionado en base a su eficiencia en la separación, su velocidad y su pureza (Linde, 2011). Por lo tanto, según Linde (2022), el helio es un gas noble incoloro e inodoro de alta pureza con niveles diminutos de oxígeno, hidrocarburos y agua, característica que lo convierte en un gas portador idóneo para los análisis por cromatografía de gases al ser inerte y minimizar el sangrado de la columna y el ruido de la línea base consiguiéndose resultados más precisos.

### **2.5.6. Automuestreador y autoinyector**

Un automuestreador, en conjunto con el autoinyector, proporciona una apropiada manipulación e inyección de las muestras generando resultados de alta fiabilidad y, dado que es automático, representa una alta reproducibilidad en los análisis al disminuir las desviaciones del proceso de muestreo e inyección gracias a la programación de los volúmenes de muestra, de la velocidad de inyección y de una serie de lavado pre y post inyección de las muestras evitando la influencia de interferentes al evitar contaminación cruzada. Al poderse establecer todas las características previas para varias muestras continuas, es de gran utilidad para llevarse a cabo corridas únicas de varias muestras al igual que la elaboración de curvas de calibración optimizándose tiempo (Thermo Scientific, 2013).

## **2.6. Validación de método analítico**

La validación de un método analítico es un proceso fundamental basado en principios científicos y fundamentos estadísticos con el objetivo demostrar la fiabilidad de los resultados y la relevancia del ensayo, al igual de demostrar que las posibles modificaciones que puedan presentarse no afecten al desempeño de análisis. Por lo que, la validación de un método analítico, y su posterior verificación, se lleva a cabo mediante la realización de una serie de pruebas normalizadas y experimentales para la obtención de los datos de los parámetros de validación tales como exactitud, precisión, robustez, linealidad, entre otros, para su posterior registro del procedimiento normalizado (Castro, Castillo & Pineda, 2020, pp. 9-26).

### **2.6.1. Linealidad**

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración de un analito en una muestra de un determinado rango de

trabajo. Esta se determina mediante la elaboración de una curva de calibración con distintos niveles de concentración del analito, los cuales se establecen de acuerdo al rango de trabajo en relación al requerimiento y finalidad del método analítico, inyectado por triplicado (Duffau et al., 2010, pp. 5-66). Como criterio de éxito, el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual 0,995 ( $r^2 \geq 0,995$ ).

### **2.6.2. Sensibilidad**

La sensibilidad corresponde a la capacidad del método analítico para distinguir pequeñas diferencias en la concentración del analito, es decir que, cuando un método es sensible, ante la presencia de una pequeña variación se genera una gran variación de respuesta respecto al resultado medido (Duffau et al., 2010, pp. 5-66). Este parámetro está representado por la pendiente de la curva de calibración, por lo que se considera que a medida que la pendiente aumenta, la sensibilidad también aumenta (UNODC, 2010, pp. 5-15).

### **2.6.3. Selectividad**

La selectividad, o especificidad, de un método analítico es la capacidad de identificar y cuantificar un analito en específico en presencia de otras sustancias interferentes tales como impurezas o productos de degradación en la muestra analizada; esta capacidad depende de la concentración del analito y del margen de error del límite de detección establecido para el método (Duffau et al., 2010, pp. 5-66).

La selectividad se determina adicionando materiales que podrían hallarse en la muestra, de modo que actúen de interferentes de tal forma que, al validar el método analítico, se garantice su correcto funcionamiento; este parámetro es sumamente importante cuando el método a validar está diseñado para la cuantificación de analitos en formulaciones y en estudios de sensibilidad (Ministerio de Salud Pública de Chile, 2015, pp. 4-14).

### **2.6.4. Límite de detección**

El límite de detección (LD) consiste en la concentración mínima de analito que el método de análisis puede diferenciar y/o detectar con fiabilidad del ruido de fondo, sin ser necesariamente cuantificable (Ministerio de Salud Pública de Chile, 2015, pp. 4-14). Para establecer el LD hay distintas maneras matemáticas de realizarlo, mediante la desviación estándar y una constante o utilizando el examen de la relación señal ruido, que por lo general se acepta un requisito mínimo de 3/1.

Uno de los métodos más usados es calcular el LD como tres veces la desviación estándar del blanco ( $S_b$ ) con respecto a la señal del mismo blanco ( $b$ ) (Castro, Castillo & Pineda, 2020, pp. 9-26). Otra forma es multiplicar la desviación estándar obtenida para los blancos por un valor constante  $k=3,29$  (Duffau et al., 2010, pp. 5-66).

#### **2.6.5. Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación (LC) se define como la cantidad mínima del analito en una muestra que el método analítico puede cuantificar con un grado comprensible de precisión y exactitud (Ministerio de Salud Pública de Chile, 2015, pp. 4-14). El LC, al ser el nivel más bajo en que el desempeño del método es aceptable, este debe ser mayor que el límite de detección (Eurachem, 2016, pp. 20-26).

Para su determinación se puede calcular de dos maneras: multiplicando el LD ya establecido con el factor 3.3 o calcular utilizando la pendiente de la curva, la desviación típica y un factor de 10 (Castro, Castillo & Pineda, 2020, pp. 9-26).

#### **2.6.6. Precisión y Repetibilidad**

En un método analítico, la precisión representa la proximidad o semejanza entre la serie de resultados obtenidos de una misma muestra de trabajo, la cual fue analizada el mismo día bajo las mismas condiciones tales como el mismo equipo, el mismo laboratorio, la misma metodología, por el mismo analista, entre otros, teniendo en cuenta su repetibilidad, ya que están estrechamente relacionadas. La precisión se estima mediante el cálculo del coeficiente de correlación (CV), dividiendo la desviación estándar por el promedio y multiplicado para cien, siendo su criterio de aceptación o de éxito  $CV \leq 2,0\%$ , siendo el porcentaje de la desviación estándar relativa la indicativa de la repetibilidad del método analítico (Fonseca Gola et al., 2020, pp. 306-328).

#### **2.6.7. Reproducibilidad**

La reproducibilidad, o también precisión intermedia, es una medida de precisión para los resultados de los ensayos realizados sobre la misma muestra, mismo equipo y misma metodología, pero efectuados por distintos analistas en diferentes días expresado por el coeficiente de variación (CV). El CV calculado para la reproducibilidad debe ser igual o mayor al estimado para la repetibilidad en relación a la misma cantidad y concentración de la muestra, ya que existe una mayor fuente de error en la reproducibilidad. Se estima que el criterio de éxito es  $CV \leq 2,0\%$  (Fonseca Gola et al., 2020, pp. 306-328).

### **2.6.8. Exactitud**

La exactitud indica la capacidad del método analítico para alcanzar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero después de repetir el ensayo un cierto número de repeticiones; se debe tener en cuenta que este parámetro de validación suele verse afectada por errores, tanto sistemáticos como aleatorios (UNODC, 2010, pp. 5-15). Para su evaluación, se determina el porcentaje de recuperación, dividiendo el promedio por el valor teórico y multiplicarlo por cien, o el sesgo que se obtiene restando el promedio o valor experimental para el valor teórico, siendo su criterio de éxito el  $100\pm 10\%$  de recuperación (Fonseca Gola et al., 2020, pp. 306-328).

### **2.6.9. Robustez**

La robustez, o denominada también como tolerancia, es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos tras llevar a cabo análisis de una muestra con el método analítico establecido, pero variando ciertas variables tal como el analista, la temperatura del ensayo, el lote del reactivo, diferente laboratorio, el instrumental usado, entre otros (Duffau et al., 2010, pp. 5-66). Es decir que, tras la presencia de pequeñas variaciones, ya sean voluntarias o involuntarias, se mide la capacidad del método para no verse afectado los resultados dados dando un indicio de su fiabilidad en su uso cotidiano (Arias & Pinilla, 2022, pp. 29-30).

El criterio de éxito para la robustez es  $CV < 2,0\%$ , ya que los resultados se comparan con los del estudio de reproducibilidad del método para obtener una medida de la tolerancia del método analítico validado (Fonseca Gola et al., 2020, pp. 306-328).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Enfoque, diseño y alcance

El presente trabajo posee un enfoque cuantitativo con diseño experimental y de tipo descriptivo, basado en la medición de antioxidante TBHQ dosificado en los aceites y mantecas vegetales utilizando un método analítico por cromatografía gaseosa.

#### 3.2. Diseño experimental

##### 3.2.1. *Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo*

La población de estudio será los aceites y grasas vegetales a base de palma y sus fracciones, palmiste, soya y de girasol elaborados en Industrias Ales.

Para el presente trabajo experimental se aplicará el siguiente sistema de muestreo aleatorio para la validación: del tanque de almacenamiento, que contiene la grasa vegetal (oleína, palma y estearina) sin antioxidante a la salida de la planta de procesamiento, se tomará una muestra diaria (1 litro) para su dosificación de antioxidante en el laboratorio, de la cual, tras el proceso de extracción del antioxidante, se realizará de 3-5 repeticiones para cada medición. Para la selección de las muestras se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

##### 3.2.2. *Criterios de inclusión*

Aquellos aceites y mantecas vegetales que cumplan con todos los requerimientos que indica la norma regulatoria en la que se rigen (norma NTE INEN y el CODEX Alimentarius).

##### 3.2.3. *Criterios de exclusión*

Aquellos aceites y mantecas vegetales que no cumplan con todos los requerimientos que indica la norma regulatoria en la que se rigen (norma NTE INEN y el CODEX Alimentarius). Basta un no cumplimiento de la misma para su exclusión.

##### 3.2.4. *Identificación de variables*

#### *3.2.4.1. Variable dependiente*

- Linealidad del método
- Precisión del método
- Exactitud del método
- Robustez

#### *3.2.4.2. Variable independiente*

- Concentración de antioxidante TBHQ
- Materia grasa

### **3.3. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación**

#### **3.3.1. Equipos**

- Cromatógrafo de Gases de marca Thermo modelo Trace1310, acoplado a un detector FID.
- Plancha de calentamiento y agitación
- Centrífuga
- Balanza analítica

#### **3.3.2. Materiales y Reactivos**

- Termómetro
- Embudo de separación
- Embudo de vidrio
- Soporte universal
- Aros de metal
- Matraz Erlenmeyer
- Balón aforado
- Pipeta tipo Pasteur
- Viales
- Tubos de vidrio
- Papel filtro
- Papel aluminio

### 3.3.3. Condiciones cromatográficas

Al inicio del presente trabajo, el laboratorio interno de Industrias Ales contaba con un método cromatográfico, cuyas condiciones se detallan en la Tabla 3-1, utilizando un cromatógrafo de gases marca Thermo modelo Trace1310, con una columna capilar TG-5MS (15m\*0.25mm\*0.25µm). Sin embargo, las condiciones fueron modificadas con el fin de obtener mejor resolución en la detección del compuesto, mismas que se describen en el apartado 4.1.

**Tabla 3-1.** Condiciones cromatográficas anteriores

<b>Tiempo de equilibrio</b>	0,5 min
<b>Temperatura inicial del horno</b>	150°C - Rampa de 10°C/min hasta llegar a 210°C (mantener 2 minutos)
<b>Temperatura final del horno</b>	210°C
<b>Volumen de inyección</b>	0,5µL
<b>Modo de inyección</b>	Split
<b>Temperatura inyector</b>	230°C
<b>Flujo del gas Carrier (Helio)</b>	0.2 mL/min
<b>Temperatura del detector (FID)</b>	250°C
<b>Flujo de aire</b>	300mL/min
<b>Flujo de hidrógeno</b>	30ml/min

Fuente: Laboratorio interno de Industrias Ales-Manta

Realizado por: Saavedra I., 2016.

### 3.3.4. Preparación de muestras

Para las muestras de aceite vegetal, se realizó una solución madre de 225 ppm pesando 0,225 g de antioxidante TBHQ y disolviéndolo en 1 Kg de oleína de palma sin antioxidante a una temperatura de  $45 \pm 3$  °C y en constante agitación. A partir de la solución madre se elaboró las muestras de 120 ppm y 190 ppm pesando 266,49 g y 421,94 g respectivamente y completando con oleína hasta los 500 g.

Para las muestras de manteca vegetal, se preparó inicialmente 1 Kg de una mezcla base de palma – estearina en una proporción 65% - 35%. Para obtener las muestras de 50 ppm y 150 ppm en manteca se pesó 111,04 g y 333,11 g de la solución madre de oleína con TBHQ (225 ppm) respectivamente y se completó con la mezcla base hasta los 500 g. Las mezclas se homogenizaron y en caso de que la mezcla base solidificó, ésta se calentó hasta fundir.

### **3.3.5. Extracción del antioxidante**

Se realizaron dos tratamientos para el proceso de extracción de antioxidante en las que se varió la cantidad de muestra, volumen de solvente, temperatura y tiempo de reposo, tanto en el baño maría como en el embudo de separación, de la siguiente forma:

**Tratamiento 1:** A 2,5 g de muestra se realizaron tres extracciones con 25 mL, 15 mL y 10 mL para aforar un balón de 50 mL. Se usó baño maría a  $50 \pm 2$  °C por 5 minutos, se decantó la muestra en el embudo de separación por 5 minutos y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos.

**Tratamiento 2:** A 50 g de muestra se realizaron tres extracciones con 30 mL, 20 mL y 15 mL para aforar un balón de 50 mL. Se utilizó un baño maría a  $45 \pm 2$  °C por 5 minutos, se decantó la muestra en el embudo de separación por 10 minutos y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos.

De los tratamientos indicados, el tratamiento 2 fue el que presentó técnicamente un mejor resultado, lo que permitió establecer el proceso del tratamiento de muestra tanto para aceite como para manteca vegetal como se detalla a continuación:

Se pesó 50 g de muestra en un Erlenmeyer de 250 mL y se adicionó 30 mL de metanol, agitando con rigor durante 30 segundos para posteriormente colocar en baño maría a  $45 \pm 2$  °C por 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se traspasó el contenido del Erlenmeyer a un embudo de separación y se decantó por 10 minutos para después recolectar el extracto en un balón de 50 mL, mientras que la parte grasa pasó a dos extracciones adicionales.

La segunda y tercera extracción se realizó con 20 mL y 15 mL de metanol, respectivamente, siguiendo el procedimiento antes descrito. Las dos extracciones se recolectaron en un balón de 50 mL con el fin de aforar, homogeneizar y centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante con ayuda de una pipeta, se filtró e inyectó la muestra al sistema cromatográfico. En caso de las mantecas vegetales, se dejó en baño maría por 15 minutos en las condiciones anteriores, y luego se pasó al embudo de separación, apartando la grasa del extracto inmediatamente, antes que se enfríe y solidifique la manteca.

### **3.3.6. Validación del método de análisis**

#### **3.3.6.1. Linealidad**

Se prepararon 7 soluciones estándar en metanol, considerando las concentraciones de mayor uso

en Industrias Ales (20 ppm, 50 ppm, 90 ppm, 120 ppm, 160 ppm, 190 ppm, 250 ppm). Estas soluciones se obtuvieron a partir de una solución madre de 250 ppm de TBHQ y se utilizaron para la construcción de una curva de calibración, con el fin de determinar la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) que, analíticamente, no debe ser menor a 0,995. Las determinaciones de las soluciones se realizaron por triplicado.

### 3.3.6.2. Sensibilidad

La sensibilidad del método se determinó tras elaborar la curva de calibración dado que este parámetro está representado por la pendiente de la curva, lo que se verifica al obtener una pendiente mayor a 0.

### 3.3.6.3. Selectividad

Para determinar la selectividad se comprobó que, en el caso de existir interferencias en la muestra inyectada, no se genere señales en la zona de elusión del analito estudiado de manera que no afecte a la determinación de éste.

### 3.3.6.4. Límite de detección y límite de cuantificación

Se preparó un estándar de concentración inferior al punto más bajo de la curva de calibración (20 ppm), para posteriormente inyectarlo 6 veces con el fin de determinar la desviación estándar y aplicarlo en la ecuación (1) para el límite de detección (LD) y en la ecuación (2) para el límite de cuantificación (LC) descritas por Castro, Castillo & Pineda (2020, pp. 9-26). Eurachem, (2016, pp. 20-26) menciona que, para obtener los LD y LC del método, los resultados debieron hacerse en base al mismo tratamiento de muestra y ser calculado en base a la misma ecuación de la recta.

$$LD: K \frac{Sb}{b} \quad k = 3 \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$LC: K \frac{Sb}{b} \quad k = 10 \quad \text{Ecuación (2)}$$

En donde:

$LD$  corresponde al límite de detección (ppm)

$LC$  corresponde al límite de cuantificación (ppm)

$k$  corresponde a un valor constante

$Sb$  corresponde a la desviación estándar del blanco (ppm)

$b$  corresponde a la concentración del blanco (ppm)

### 3.3.6.5. Precisión

- *Repetibilidad:* Se realizaron 3 extracciones para cada uno de los niveles de concentración establecidos (120 ppm y 190 ppm en aceite; 50 ppm y 150 ppm en manteca) inyectándose cada uno por triplicado, con el fin de determinar el coeficiente de variación (CV) con la ecuación (3) de manera que cumpla el criterio de éxito planteado ( $\leq 2,0\%$ ); las determinaciones lo realizaron el mismo analista, el mismo día, en las mismas condiciones de trabajo.

$$CV = \frac{S}{\mu} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

En donde:

CV corresponde al coeficiente de variación (%)

S corresponde a la desviación estándar de las lecturas (ppm)

$\mu$  corresponde al promedio de la totalidad de lecturas (ppm)

Se verificó estadísticamente la repetibilidad del método para cada nivel de concentración comparando los resultados obtenidos de las tres extracciones realizado por el mismo analista mediante un análisis de varianzas de un factor (ANOVA) utilizando un nivel de significancia de 0,05.

- *Precisión intermedia:* Se realizaron 3 extracciones para cada uno de los niveles de concentración establecidos (120 ppm y 190 ppm en aceite; 50 ppm y 150 ppm en manteca) inyectándose cada uno por triplicado, con el fin de determinar el coeficiente de variación (CV) de manera que cumpla el criterio de éxito planteado ( $CV \leq 2,0\%$ ). Las determinaciones lo realizaron distintos analistas en las mismas condiciones de trabajo.

La precisión intermedia del método para cada nivel de concentración se verificó estadísticamente comparando los resultados obtenidos por los dos analistas mediante la prueba t-student, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 0,05.

### 3.3.6.6. Exactitud

Se preparó dos muestras en aceite (120 ppm y 190 ppm) y dos en manteca (50 ppm y 150 ppm) a partir de una solución madre con antioxidante, para determinar los porcentajes de recuperación ( $\%_{Rec}$ ) por medio de la ecuación (4) a partir de los resultados dados por el equipo y el valor teórico de cada nivel, considerando 3 inyecciones para cada una de las tres extracciones en cada nivel. Los  $\%_{Rec}$  debe cumplir con el criterio de éxito de  $100 \pm 10\%$ .

$$\%Recuperación = \frac{x}{x_{ref}} \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

En donde:

$x$  corresponde al resultado de la lectura (ppm)

$x_{ref}$  corresponde al valor de referencia o teórico (ppm)

#### 3.3.6.7. Robustez

Se consideró realizar pequeñas variaciones tales como cambios en la temperatura del inyector y del detector ( $\pm 5$  °C), con el fin de medir la capacidad de afectación del método analítico. Se realizó una inyección de cada nivel de concentración establecidos (120 ppm y 190 ppm en aceite; 50 ppm y 150 ppm en manteca) para cada temperatura establecida con el fin de determinar el CV entre sí, de manera que se cumpla el criterio de éxito ( $CV \leq 2,0\%$ ).

#### 3.3.6.8. Verificación interlaboratorio

Se prepararon tres muestras con concentración de 50, 120 y 200 ppm, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3.3.4. Se solicitó la cuantificación del antioxidante al laboratorio acreditado Eurofins con el fin de comparar ambos resultados mediante el porcentaje de sesgo calculado con la ecuación (5), de manera que se cumpla el criterio de éxito ( $\pm 3,0\%$ ).

$$b(\%) = \frac{X - X_{ref}}{X_{ref}} \times 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

En donde:

$b$  (%) corresponde al sesgo relativo de los resultados en porcentaje

$X$  corresponde al resultado reportado por el método interno de Industrias Ales (ppm)

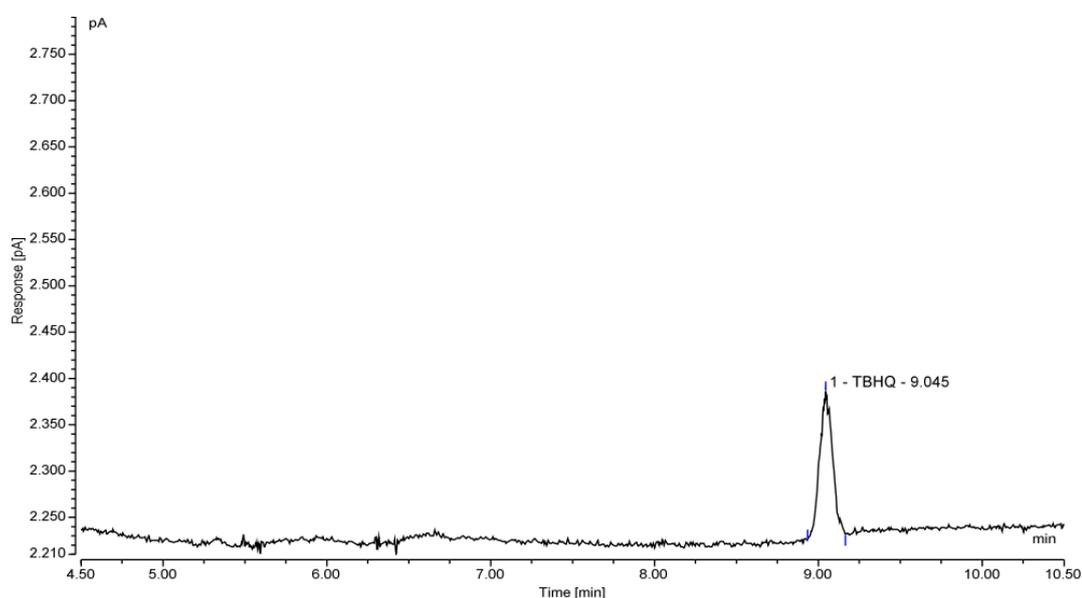
$X_{ref}$  corresponde al resultado del laboratorio Eurofins (ppm)

## CAPÍTULO IV

### 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Condiciones cromatográficas

La Ilustración 4-1 muestra el cromatograma obtenido a partir de las condiciones cromatográficas con las que contaba el laboratorio interno de Industrias Ales previo al presente estudio (descritas en la Tabla 3-1). Como se observa, existe una baja resolución del pico correspondiente al antioxidante TBHQ, siendo irregular, con varios puntos máximos, además de inestabilidad en la línea base. Por tanto, se realizó una búsqueda bibliográfica y a través de experimentación, se plantearon nuevas condiciones, mismas que se describen en la Tabla 4-1.



**Ilustración 4-1.** Cromatograma con las condiciones cromatográficas anteriores

Realizado por: Bucay J., 2024.

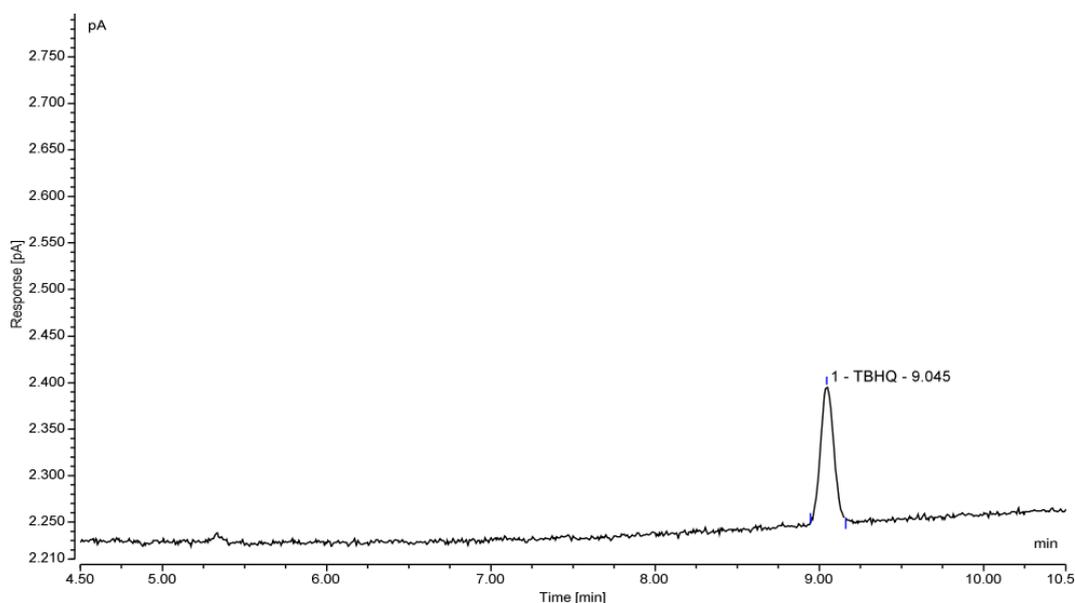
**Tabla 4-1.** Nuevas condiciones cromatográficas

<b>Tiempo de equilibrio</b>	0,5 min
<b>Temperatura inicial del horno</b>	140°C (mantener 2 minutos) - Rampa 1 de 15°C/min hasta llegar a 180°C (mantener 2 minutos) - Rampa 2 de 10°C/min hasta llegar a 210°C (mantener 2 minutos)
<b>Temperatura final del horno</b>	210°C
<b>Volumen de inyección</b>	1µL
<b>Modo de inyección</b>	Split

<b>Temperatura inyector</b>	220°C
<b>Flujo del gas Carrier (Helio)</b>	0.2 mL/min
<b>Temperatura del detector (FID)</b>	250°C
<b>Flujo de aire</b>	300mL/min
<b>Flujo de hidrógeno</b>	30ml/min

Realizado por: Bucay J., 2024.

Con las nuevas condiciones se obtuvo el cromatograma de la ilustración 4-2, en donde el pico correspondiente al antioxidante de interés mejoró su resolución. Esta mejora se logró con la incorporación de una nueva rampa de temperatura en el método y la disminución de la temperatura de inyección ya que, según SGL (2019), la presencia de picos divididos o poca resolución pueden estar relacionadas con la temperatura de la columna debido a la coelución entre el analito y algún contaminante; o del inyector por la degradación de la muestra en el inyector.



**Ilustración 4-2.** Cromatograma con las nuevas condiciones cromatográficas

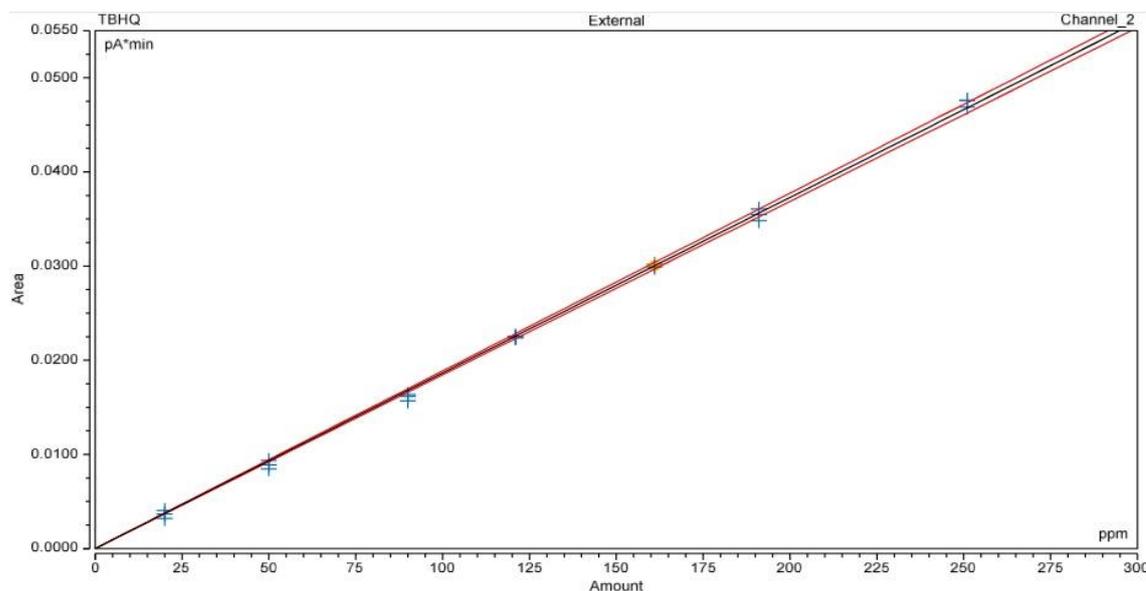
Realizado por: Bucay J., 2024.

## 4.2. Parámetros de validación

### 4.2.1. Linealidad y sensibilidad del método

Tras la preparación de los estándares con las concentraciones planteadas y su lectura se obtuvo, mediante el software Chromeleon, la curva de calibración de antioxidante TBHQ que se muestra en la ilustración 4-3, junto a la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación del mismo, indicados en la tabla 4-2. De acuerdo a Eurachem (2016, pp. 18-20), la linealidad del método es un

parámetro de la validación que puede evaluarse mediante la visualización del gráfico en conjunto con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), de modo que al poseer un  $r^2$  de 0,9992 que es mayor al criterio de éxito de 0,995 se cumple con este parámetro. Este criterio muestra que, con el método establecido en el apartado 3.3.6.1., el área bajo la curva a los 8,9 - 9,2 minutos es proporcional a la concentración de TBHQ en un rango de 20 a 250 ppm.



**Ilustración 4-3.** Curva de calibración para TBHQ

Realizado por: Bucay J., 2024.

**Tabla 4-2.** Resultados de la linealidad del método

<b>Ecuación:</b>	<b><math>y = 0,0002x - 0,0005</math></b>
<b>Coefficiente de correlación (<math>r^2</math>):</b>	<b>0,9992</b>

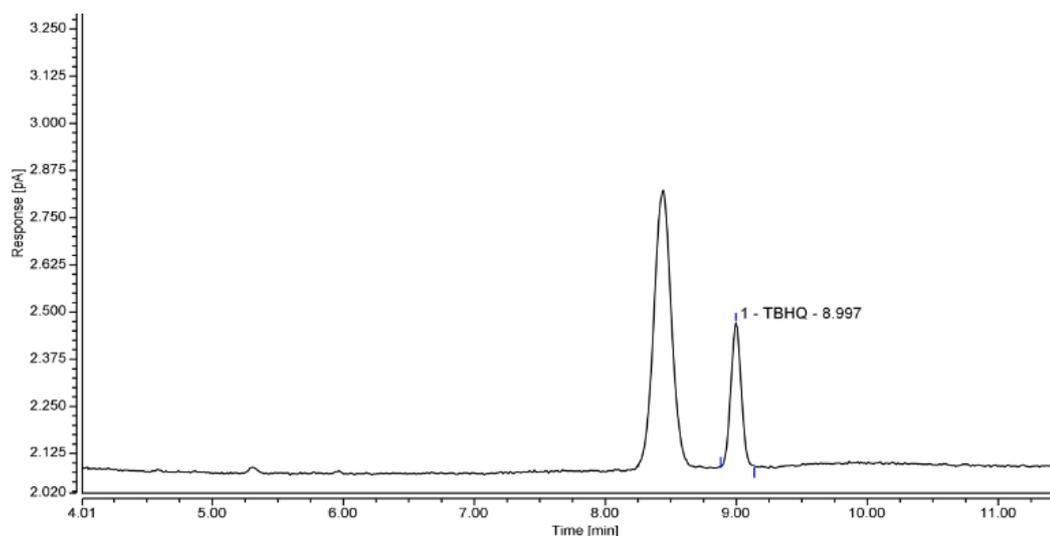
Realizado por: Bucay J., 2024.

Por otro lado, a partir de la ecuación se puede interpretar que el método es ligeramente sensible dado que la pendiente obtenida es de 0,002. UNODC, (2010, pp. 5-15) indica que este parámetro matemático es indicativo de la sensibilidad y mientras se encuentre más lejano de 0, el método presentará una mayor sensibilidad. La sensibilidad permite observar la capacidad de la respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito, por ende, al ser la pendiente de la recta cercano a cero, el método propuesto no presentará una gran variación en la respuesta ante una mínima variación en la concentración (Espinoza, 2018, pp. 10-13).

#### 4.2.2. *Selectividad del método*

El cromatograma, en relación Tiempo vs Respuesta, obtenido tras la inyección de un extracto contaminado con antioxidante BHT (ilustración 4-4) demuestra la selectividad del método dado

que el pico que correspondería al BHT no interfiere sobre el pico del antioxidante de interés (TBHQ), permitiendo la identificación y cuantificación por el cromatógrafo de gases. Esto es a causa de las diferencias fisicoquímicas entre ambos antioxidantes de manera que el antioxidante BHT tiene un menor punto de fusión y ebullición que el TBHQ (Carl Roth, 2017), y que este último es más polar que el BHT por lo que, al ser la fase estacionaria apolar, se verá facilitado la elución del BHT primero que el del TBHQ (ThermoFisher Scientific, 2023).



**Ilustración 4-4.** Cromatograma del analito con contaminante (BHT)

Realizado por: Bucay J., 2024.

#### 4.2.3. *Límite de Detección y Cuantificación del método*

La tabla 4-3 indica los resultados de las diferentes mediciones de una solución de TBQH a una concentración de 10 ppm, además de los parámetros estadísticos y resultados del límite de detección (LD) y cuantificación (LC) del método, siendo este 0,52 ppm y 1,90 ppm respectivamente. El LD es la concentración mínima que se puede detectar de un analito pero sin la posibilidad de cuantificarlo, mientras que el LC es la concentración mínima cuantificable que se puede obtener con una imprecisión aceptable, en consecuencia el LC siempre va a ser mayor que el LD (Cáñez & García, 2015, pp. 32-39).

Carranza (2016, pp. 28-31), establece en su estudio por HPLC un valor de 2,00 ppm (mg/Kg) como límite de cuantificación para el antioxidante TBHQ variando por 0,1 ppm. Esta variación surge de la propia desviación y sensibilidad de la instrumentación al momento de cuantificar el respectivo estándar que, en el caso del presente estudio es de 0,2 ppm.

**Tabla 4-3.** Resultados para la determinación del LD y LQ

Concentraciones detectadas del estándar de 10 ppm					
11,57	11,16	10,80	10,46	10,32	10,89
Concentración	Desviación Estándar ( $S_b$ )		Promedio	N° muestras	
10 ppm	0,19		10,86	6	
Límite de detección			Límite de cuantificación		
LD= 0,57 ppm			LC= 1,90 ppm		

Realizado por: Bucay J., 2024.

**4.2.4. Precisión del método en aceites y mantecas vegetales****4.2.4.1. Repetibilidad**

En la tabla 4-4 y 4-5 se muestran los resultados de las distintas mediciones de las extracciones obtenidos de los estándares de 50, 150, 120 y 190 ppm en manteca vegetal y aceite vegetal respectivamente. Se observa que el método analítico mostró una buena repetibilidad considerando a un único analista al conseguirse coeficientes de variación inferiores al 2,0%, criterio de éxito establecido internamente.

Además, luego de comprobar que los datos cumplen los criterios para realizar el análisis ANOVA, que se refiere a normalidad, homocedasticidad e independencia como lo indica Dagnino (2014, pp. 306-310), se observa que los valores-p reportados son mayores al nivel de significancia de 0,05 por lo que se determinó, con un nivel de confianza del 95%, que las tres medias correspondientes a los grupos de extracción (A, B y C) son las mismas estadísticamente verificando la repetibilidad del método.

**Tabla 4-4.** Resultados para repetibilidad en manteca vegetal

Estándar	Extracción	Concentración	CV	ANOVA
50 ppm	A	49,94	$\bar{X} = 49,38$ $S = 0,48$ CV = 0,98%	Valor-p = 0,82  $\alpha = 0,05$
		49,15		
		49,53		
	B	49,12		
		49,96		
		48,87		
	C	48,73		
		49,15		
		49,96		
	A	153,24	$\bar{X} = 150,12$	Valor-p = 0,46
		147,50		
		153,92		

<b>150 ppm</b>	<b>B</b>	149,02	$S = 2,38$ $CV = 1,59\%$	$\alpha = 0,05$
		149,09		
		151,39		
	<b>C</b>	150,19		
		146,91		
		149,80		

Realizado por: Bucay J., 2024.

**Tabla 4-5.** Resultados para repetibilidad en aceite vegetal

<b>Estándar</b>	<b>Extracción</b>	<b>Concentración</b>	<b>CV</b>	<b>ANOVA</b>
<b>120 ppm</b>	<b>A</b>	121,02	$\bar{X} = 120,33$ $S = 1,18$ $CV = 0,98\%$	Valor-p = 0,84 $\alpha = 0,05$
		118,96		
		121,91		
	<b>B</b>	120,06		
		119,37		
		120,52		
	<b>C</b>	121,75		
		120,74		
		118,60		
<b>190 ppm</b>	<b>A</b>	193,56	$\bar{X} = 191,45$ $S = 1,60$ $CV = 0,84\%$	Valor-p = 0,37 $\alpha = 0,05$
		191,22		
		192,94		
	<b>B</b>	192,76		
		189,74		
		190,70		
	<b>C</b>	191,44		
		192,13		
		188,59		

Realizado por: Bucay J., 2024.

#### 4.2.4.2. Precisión intermedia

En las tablas 4-6 y 4-7 se presentan los resultados del estudio para precisión intermedia en estándares de manteca y aceite vegetal, respectivamente. Los CV obtenidos por ambos analistas para cada concentración van desde 0,60% hasta 1,80% siendo menor al criterio de éxito de 2,0%. Gordón & Camargo, (2015, pp. 55-63) indican que el CV es una medida de dispersión que suele utilizarse frecuentemente para aceptar o rechazar la validez de los resultados, por lo que se reconoció la precisión del mismo.

Además, en base al valor-p de la prueba t-student realizada, se determinó que no existen diferencias significativas en la cuantificación de TBHQ entre los dos analistas ( $p > 0,05$ ), corroborando así la precisión del método.

**Tabla 4-6.** Resultados para precisión intermedia en manteca vegetal

Estándar	Extracción	Concentración Analista 1	Concentración Analista 2	CV
50 ppm	A	49,94	49,12	<b>Analista 1:</b> $\bar{X} = 49,38$ $S = 0,48$ $CV\% = 0,98\%$  <b>Analista 2:</b> $\bar{X} = 49,74$ $S = 0,49$ $CV = 0,99\%$
		49,15	49,95	
		49,53	49,67	
	B	49,12	49,93	
		49,96	49,84	
		48,87	50,25	
	C	48,73	48,84	
		49,15	49,71	
		49,96	50,36	
150 ppm	A	153,24	150,79	<b>Analista 1:</b> $\bar{X} = 150,12$ $S = 2,38$ $CV = 1,59\%$  <b>Analista 2:</b> $\bar{X} = 150,39$ $S = 1,41$ $CV = 0,94\%$
		147,50	152,57	
		153,92	151,66	
	B	149,02	147,43	
		149,09	150,46	
		151,39	150,28	
	C	150,19	150,11	
		146,91	150,60	
		149,80	149,65	
<b>Prueba t-student 50 ppm</b>		$gl = 16$ $t_{cal} = -1,58$ $t_{crit} = 2,12$		Valor-p = 0,13 $\alpha = 0,05$
<b>Prueba t-student 150 ppm</b>		$gl = 16$ $t_{cal} = -0,30$ $t_{crit} = 2,12$		Valor-p = 0,77 $\alpha = 0,05$

Realizado por: Bucay J., 2024.

**Tabla 4-7.** Resultados para precisión intermedia en aceite vegetal

Estándar	Extracción	Concentración Analista 1	Concentración Analista 2	CV
120 ppm	A	121,02	121,24	<b>Analista 1:</b> $\bar{X} = 120,33$ $S = 1,18$ $CV = 0,98\%$  <b>Analista 2:</b> $\bar{X} = 119,40$ $S = 2,14$ $CV = 1,79\%$
		118,96	120,14	
		121,91	121,12	
	B	120,06	120,78	
		119,37	120,72	
		120,52	115,82	
	C	121,75	120,53	
		120,74	118,04	
		118,60	116,22	
190 ppm	A	193,56	193,87	<b>Analista 1:</b> $\bar{X} = 191,45$ $S = 1,60$ $CV = 0,84\%$  <b>Analista 2:</b> $\bar{X} = 191,10$ $S = 1,21$ $CV = 0,63\%$
		191,22	191,68	
		192,94	190,15	
	B	192,76	190,51	
		189,74	191,05	
		190,70	189,63	
	C	191,44	191,40	
		192,13	190,80	
		188,59	190,83	

<b>Prueba t-student</b> <b>120 ppm</b>	$gl = 16$ $t_{cal} = 1,14$ $t_{crit} = 2,12$	Valor-p = 0,27 $\alpha = 0,05$
<b>Prueba t-student</b> <b>190 ppm</b>	$gl = 16$ $t_{cal} = 0,52$ $t_{crit} = 2,12$	Valor-p = 0,61 $\alpha = 0,05$

Realizado por: Bucay J., 2024.

#### 4.2.5. Exactitud del método en aceites y mantecas vegetales

En las tablas 4-8 y 4-9 se muestran los resultados del estudio realizado para la determinación de la exactitud del método analítico con un porcentaje de recuperación que abarca un rango de 97% hasta 103% en aceite y un rango de 98% a 102% en manteca cumpliendo con el criterio de éxito establecido de  $100 \pm 10\%$ . De acuerdo a Eurachem (2016, pp. 30-32), la exactitud es de suma importancia dado que demuestra que los resultados conseguidos por el método propuesto son equivalentes o semejantes al valor teórico indicando eficiencia en el método de extracción y cuantificación.

Sin embargo, el de menor porcentaje de recuperación es el de 50 ppm en manteca vegetal lo que podría deberse a un margen de error durante la preparación del estándar o bajo la premisa de que, a más disminuía la concentración del analito, mayor será el coeficiente de variación (Duffau et al., 2010, pp. 5-66).

**Tabla 4-8.** Resultados para exactitud en manteca vegetal

Estándar	Extracción	Concentración	% Recuperación
<b>50 ppm</b>	A	49,94	99,87
		49,15	98,31
		49,53	99,06
	B	49,12	98,24
		49,96	99,92
		48,87	97,74
	C	48,73	97,46
		49,15	98,30
		49,96	99,93
<b>PROMEDIO</b>		<b>49,38</b>	<b>98,76</b>
<b>150 ppm</b>	A	153,24	102,16
		147,50	98,33
		153,92	102,61
	B	149,02	99,34
		149,09	99,39
		151,40	100,93
		150,19	100,13

	C	146,91	97,94
		149,80	99,86
<b>PROMEDIO</b>		<b>150,12</b>	<b>100,08</b>

Realizado por: Bucay J., 2024.

**Tabla 4-9.** Resultados para exactitud en aceite vegetal

Estándar	Extracción	Concentración	% Recuperación
<b>120 ppm</b>	A	121,02	100,85
		118,96	99,13
		121,91	101,59
	B	120,06	100,05
		119,37	99,47
		120,52	100,44
	C	121,75	100,44
		120,74	101,46
		118,60	100,62
<b>PROMEDIO</b>		<b>120,33</b>	<b>100,27</b>
<b>190 ppm</b>	A	193,56	101,87
		191,22	100,64
		192,94	101,55
	B	192,76	101,45
		189,74	99,86
		190,70	100,37
	C	191,44	100,76
		192,13	101,12
		188,59	99,26
<b>PROMEDIO</b>		<b>191,45</b>	<b>100,77</b>

Realizado por: Bucay J., 2024.

#### 4.2.6. Robustez del método en aceite y manteca vegetal

Se realizó el estudio de robustez para cada nivel de concentración en su respectiva matriz grasa (aceite y manteca vegetal), considerando cambios en las temperaturas ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) del inyector y del detector de forma individual, cuyos resultados se presentan en la tabla 4-10 y la tabla 4-11. Eurachem (2016, pp. 38-39) menciona que la robustez evalúa la fiabilidad del método durante su uso habitual, al visualizar que permanece los resultados permanecen estables y congruentes ante pequeñas variaciones en el método.

Al comparar mediante el CV, el resultado del método con la temperatura nominal en inyector y detector normal y el modificado ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), se concluye que el método es robusto al tener coeficientes de variación menores al 2,0%. De los cuatro niveles estudiados, el de 50 ppm en manteca vegetal es el que mayor variación demostró (tabla 4-9) puesto que, mientras más se

acerque la medida a cero menor es su confiabilidad al aumentar fácilmente la desviación y su variación (Gordón & Camargo, 2015, pp. 55-63).

**Tabla 4-10.** Resultados para robustez en manteca vegetal

Temperatura (°C) del inyector			Temperatura (°C) del detector		
Nominal (220°C)	Inferior (215°C)	Superior (225°C)	Nominal (250°C)	Inferior (245°C)	Superior (255°C)
49,94	50,92	51,10	49,94	50,81	49,80
<b>Promedio</b>	50,43	50,52	<b>Promedio</b>	50,37	49,87
<i>S</i>	0,70	0,83	<i>S</i>	0,62	0,10
<b>CV%</b>	1,39	1,63	<b>CV%</b>	1,22	0,20
Nominal (220°C)	Inferior (215°C)	Superior (225°C)	Nominal (250°C)	Inferior (245°C)	Superior (255°C)
150,19	152,38	153,14	150,19	152,03	151,41
<b>Promedio</b>	151,29	151,67	<b>Promedio</b>	151,11	150,80
<i>S</i>	1,55	2,09	<i>S</i>	1,30	0,86
<b>CV%</b>	1,02	1,38	<b>CV%</b>	0,86	0,57

Realizado por: Bucay J., 2024.

**Tabla 4-11.** Resultados para robustez en aceite vegetal

Temperatura (°C) del inyector			Temperatura (°C) del detector		
Nominal (220°C)	Inferior (215°C)	Superior (225°C)	Nominal (250°C)	Inferior (245°C)	Superior (255°C)
120,74	119,60	120,95	120,74	120,88	119,46
<b>Promedio</b>	120,17	120,85	<b>Promedio</b>	120,81	120,10
<i>S</i>	0,80	0,15	<i>S</i>	0,10	0,90
<b>CV%</b>	0,67	0,12	<b>CV%</b>	0,08	0,75
Nominal (220°C)	Inferior (215°C)	Superior (225°C)	Nominal (250°C)	Inferior (245°C)	Superior (255°C)
190,70	192,30	191,47	190,70	191,25	192,85
<b>Promedio</b>	191,50	191,09	<b>Promedio</b>	190,98	191,78
<i>S</i>	1,13	0,54	<i>S</i>	0,39	1,52
<b>CV%</b>	0,59	0,28	<b>CV%</b>	0,20	0,79

Realizado por: Bucay J., 2024.

#### 4.2.7. Verificación interlaboratorio

En la tabla 4-12 se presentan los resultados de la cuantificación de antioxidante de los tres estándares analizados por el laboratorio interno de Industrias Ales y por el laboratorio externo Eurofins. Dentro de los valores observados, el sesgo positivo de la prueba B indica que el valor está ligeramente por encima del valor de referencia y el sesgo negativo de las pruebas A y C indican que el valor está por debajo del valor de referencia (Support Minitab, 2023). Sin embargo, se

observó que los porcentajes de sesgo son cercanos a cero y bajo el criterio de éxito (sesgo  $\pm 3,0\%$ ), lo que indica que la diferencia entre ambos resultados no es significativa.

Cabe señalar que el laboratorio externo se encuentra acreditado, lo que garantiza la calidad y confiabilidad de los resultados (Rosero, Pincay & Solorzano, 2023, pp. 1-3). De esta forma, se valida los resultados del método desarrollado en el laboratorio interno de Industrias Ales mediante el presente trabajo, para la cuantificación de TBHQ en aceites y mantecas vegetales.

**Tabla 4-12.** Resultados para la verificación del método

	<b>Industrias Ales</b>	<b>Eurofins</b>	<b>Sesgo (%)</b>
<b>PRUEBA A</b>	46,29	47,00	-1,51
<b>PRUEBA B</b>	120,09	120,00	0,08
<b>PRUEBA C</b>	199,87	200,00	-0,06

**Realizado por:** Bucay J., 2024.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se determinaron las condiciones adecuadas requeridas para el tratamiento de muestra que faciliten la máxima extracción del antioxidante TBHQ, tales como una temperatura de 45-50°C y metanol como solvente, de manera que cumplieron los criterios de éxito planteados para la validación del método, para diferentes niveles de concentración del antioxidante.
- Se establecieron condiciones cromatográficas adecuadas para la identificación y cuantificación del antioxidante TBHQ, utilizando una rampa de temperatura en el horno, flujo constante del gas *carrier* (helio) y temperaturas fijas tanto para el inyector como para el detector FID, mejorando la resolución del pico del analito y de la selectividad del método al mantener una distancia del pico del TBHQ ante una posible impureza.
- Se comprobó la validez del método a través de una comparación de resultados entre el laboratorio interno de Industrias Ales y el laboratorio acreditado Eurofins dado que el porcentaje de sesgo estuvo dentro del criterio de éxito ( $\pm 3,0\%$ ), asegurando así la veracidad de los resultados proporcionados por el método analítico desarrollado en el presente trabajo.

#### 5.2. Recomendaciones

- Durante el tratamiento de muestra, se aconseja que la temperatura del baño maría no supere los 60°C debido a que favorecería la volatilización del solvente durante el proceso, alterando el resultado final.
- Previo al proceso de extracción del antioxidante TBHQ en muestras de aceite o manteca, se recomienda la agitación de la muestra de manera que se garantice la homogeneidad del analito.
- De realizarse estándares en aceites y/o mantecas, se sugiere se aplique agitación constante y calor para una correcta disolución del antioxidante en la matriz, sin superar los 50°C puesto que se promovería la degradación del antioxidante obteniendo una concentración menor a la esperada.

- Es importante realizar la limpieza de la columna cromatográfica a 250°C por 10 min, cada 3 inyecciones, con el fin de eliminar cualquier impureza que pueda permanecer y ser un posible interferente en la señal final del analito a reportar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ARIAS, Daniela & PINILLA, Luis.** Validación de la metodología analítica para la cuantificación de metil-p-benzoquinona por cromatografía de gases (GC). (Trabajo de titulación). Universidad El Bosque. Bogotá-Colombia. 2022. págs. 1-39.
2. **BADUI, Salvador.** *Química de los alimentos*. 5ª ed. México D.F : PEARSON, 2012, pág. 254.
3. **CÁÑEZ, María & GARCÍA, Alejandro.** "Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible". *Biotecnia* [en línea], 2015, (México), vol. 17 (1), págs. 32–39. [Consulta: 14 noviembre 2023]. ISSN 1665-1456. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=672971115006>
4. **CARBAJAL, Jocelyn; et al.** "Estado de la información del consumo en México de antioxidantes sintéticos en alimentos ultra-procesados, basados en los productos de la canasta básica". *Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional* [en línea], 2021, (México), vol. 31 (58), págs. 1–20. [Consulta: 02 octubre 2023]. ISSN 2395-9169. Disponible en: <https://doi.org/10.24836/es.v31i58.1143>.
5. **CARL ROTH.** *Ficha de datos de seguridad: Butilhidroxitolueno ROTI@STAR Primary Standard* [Blog]. 2017. [Consulta: 15 enero 2024]. Disponible en: [https://www.repsol.pe/imagenes/repsolporpe/es/PETROLEOINDUSTRIAL500\\_tcm76-83282.pdf%0Ahttps://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/0/SDB\\_0183\\_ES\\_ES.pdf](https://www.repsol.pe/imagenes/repsolporpe/es/PETROLEOINDUSTRIAL500_tcm76-83282.pdf%0Ahttps://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/0/SDB_0183_ES_ES.pdf)
6. **CARRANZA, Eliana.** *Validación del método cuantitativo para la determinación de antioxidantes en aceites y grasas por cromatografía líquida de alta resolución, para el laboratorio regional del aseguramiento de la calidad nestlé antigua* [en línea]. (Trabajo de titulación). Universidad de San Carlos de Guatemala. Ciudad de Guatemala-Guatemala. 2016. págs. 28-31. [Consulta: 17 septiembre 2023]. Disponible en: <http://emecanica.ingenieria.usac.edu.gt/sitio/wp-content/subidas/6ARTÍCULO-III-INDESA-SIE.pdf>
7. **CASTRO, S.; et al.** *Aportes analíticos al estudio de aguas residuales y potables*. Cali: Universidad Santiago de Cali, 2020. ISBN 0000000327251, pp. 9–26.
8. **CFS.** *Certificate of Analysis: Tert-Butyl Hydroquinone FCC*.

9. **COBA, Gabriela.** *El consumo de aceite cae cerca de 4% en los hogares ecuatorianos.* [Blog]. 2022. [Consulta: 14 junio 2023]. Disponible en: <https://www.primicias.ec/noticias/economia/consumo-aceite-aumento-precios-ecuador/>.
10. **COMISIÓN EUROPEA.** *Reglamento (EU) N° 1129/2011: Aditivos Alimentarios.* [Blog]. 2011. [Consulta: 11 octubre 2023]. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2011/295/L00001-00177.pdf>
11. **DAGNINO, Jorge.** "Bioestadística y Epidemiología: Análisis de varianza". *Revista Chilena de Anestesia* [en línea], 2014, (Chile), vol. 43 (4), págs. 306–310. [Consulta: 16 febrero 2024]. ISSN: 07164076. Disponible en: DOI 10.2307/j.ctvvn8k0.7.
12. **DNV.** *FSSC 22000 - Certificación en seguridad alimentaria* [Blog]. 2020. [Consulta: 15 noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.dnv.es/services/fssc-22000-certificacion-en-seguridad-alimentaria-5161>
13. **DOMÍNGUEZ, Elizabeth; et al.** "Aprovechamiento de las semillas de zapallo para la elaboración de un aceite vegetal comestible". *Observatorio de la Economía Latinoamericana* [en línea], 2019, (Ecuador), vol. 1 (1), págs. 1–16. [Consulta: 29 octubre 2023]. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/oel/2019/07/elaboracion-aceite-vegetal.html>
14. **DUFFAU, Boris; 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 de Chile, 2010, págs. 5-66.
15. **ESPINOZA, E.** "Guía para la validación de métodos de ensayo en laboratorios clínicos" [En línea]. 2018. [Consulta: 15 noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.acreditacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/02/G03-R00-Guia-Validacion-Lab-clini.pdf>
16. **EURACHEM.** *Guía Eurachem: La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos.* Madrid-España: EuraChem, 2016. ISBN 9789187461590, págs. 1-65.
17. **FENG, Tao; et al.** *Evaluation Technologies for Food Quality.* Shanghai: Elsevier Inc, 2019. ISBN 9780128142189, págs. 219–265.

18. **Fisher Scientific S.L.** *Thermo Scientific™ Columns para GC TraceGOLD TG-5MS* [Blog]. 2019. [Consulta: 11 octubre 2023] Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/tracegold-tg-5ms-gc-columns/10584685>.
19. **FONSECA GOLA, Antonio; et al.** "Desarrollo y validación de un método de cromatografía gaseosa para la determinación de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico en solución antiséptica". *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* [en línea], 2020, (Colombia), vol. 49 (2), págs. 306–328. [Consulta: 05 septiembre 2023]. ISSN 0034-7418. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n2.89484>.
20. **GORDÓN, Román & CAMARGO, Ismael.** "Selección de estadísticos para la estimación de la precisión experimental en ensayos de maíz". *Agronomía Mesoamericana* [en línea], 2015, (Panamá), vol. 26 (1), págs. 55–63. [Consulta: 12 enero 2024]. ISSN 2215-3608. Disponible en: [10.15517/am.v26i1.16920](https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16920).
21. **GUERRERO, Jessica.** Estabilidad del aceite de fritura de chifles. [En línea]. (Trabajo de titulación). Universidad de Piura. Piura-Perú. 2005. pág.11. [Consulta: 2023-10-12]. Disponible en: [https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1485/ING\\_436.pdf](https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1485/ING_436.pdf)
22. **HERNÁNDEZ, José; et al.** "Validación del método analítico por HPLC/UV para la determinación de terbutil hidroxiquinona (TBHQ) en aceites vegetales". *Departamento de Sistemas Biológicos*, vol. 21, n° 1, (2019), (México). págs. 1–4.
23. **IBARRA, Zulay.** "Antioxidantes producidos por microorganismos acuáticos y terrestres con uso potencial en cosméticos". *Actualidades Biológicas* [en línea], 2022, (Ecuador), vol. 44 (116), págs. 1–19. [Consulta: 03 noviembre 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v44n116a02>
24. **ICONTEC.** *FSSC 22000, Sistema de Gestión de la Inocuidad Alimentaria*. [Blog]. 2022. [Consulta: 03 noviembre 2023]. Disponible en: [https://www.icontec.org/eval\\_conformidad/fssc-22000-sistema-de-gestion-de-la-inocuidad-alimentaria/](https://www.icontec.org/eval_conformidad/fssc-22000-sistema-de-gestion-de-la-inocuidad-alimentaria/).
25. **Industrias Ales.** *¡Industrias Ales una empresa socialmente responsable!* [Blog]. [Consulta: 01 noviembre 2023] Disponible en: <https://www.ales.com.ec/?responsabilidad=reduccion-de-materiales#:~:text=Uno de los pilares que,Manufactura%2C Certificación Kosher%2C>

BASC.

26. **ISOTOOLS.** *Nueva actualización de FSSC 22000.* [Blog]. 2020. [Consulta: 31 octubre 2023]. Disponible en: <https://www.isotools.us/2019/05/08/nueva-actualizacion-de-fssc-22000/>.
27. **JAMANCA, Nicodemo & ALFARO, Sarela.** *Antioxidantes en los alimentos.* Lima-Perú: Editorial UNAB, 2017, págs. 1-3.
28. **JUNCOS, N.; et al.** "El sinergismo de aceites esenciales como modelo para prevenir el deterioro oxidativo y microbiano de los alimentos". *Nexo Agropecuario* [en línea], 2021, (Argentina), vol. 9 (1), págs. 52–58. [Consulta: 15 septiembre 2023]. ISSN 2346-917X. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/185196>
29. **KHEZERLOU, Arezou; et al.** "Alarming impact of the excessive use of tert-butylhydroquinone in food products: A narrative review". *Toxicology reports* [en línea], 2022, (Iran), vol. 9 (1), págs. 1066–1075. [Consulta: 25 septiembre 2023]. ISSN 2214-7500. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.04.027>
30. **LINDE.** *Aire Sintético Laboratorio.* [Blog]. 2020. [Consulta: 13 noviembre 2023]. Disponible en: [https://www.linde-gas.es/es/images/Aire\\_Sintético\\_Laboratorio\\_tcm316-612678.pdf](https://www.linde-gas.es/es/images/Aire_Sintético_Laboratorio_tcm316-612678.pdf)
31. **LINDE, Abelló.** *Cromatografía de gases.* [Blog]. 2011. [Consulta: 13 noviembre 2023]. Disponible en: [https://www.linde-gas.es/es/images/Cromatografía\\_de\\_gases\\_19107-01\\_tcm316-120150.pdf](https://www.linde-gas.es/es/images/Cromatografía_de_gases_19107-01_tcm316-120150.pdf)
32. **LIU, Wei; et al.** "Deep eutectic solvents as switchable solvents for highly efficient liquid–liquid microextraction of phenolic antioxidant: Easily tracking the original TBHQ in edible oils". *Food Chemistry* [en línea], 2022, (China), vol. 377 (1), págs. 124-136. [Consulta: 12 diciembre 2023]. ISSN 0308-8146. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131946>.
33. **Ministerio de Salud Pública de Chile.** "Guía técnica para la realización de la validación de métodos de ensayo" [en línea]. 2015. [Consulta: 25 octubre 2023]. Disponible en: [https://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resolución\\_exenta\\_201\\_2015.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resolución_exenta_201_2015.pdf)

34. **NTE INEN 1313 : 2015.** *Mantecas comestibles. Requisitos.*
35. **PARKER HANNIFIN CORPORATION.** *Hydrogen Generators For GC & GC/MS Fuel and Carrier Gas Applications (99.99999+ Purity)* [Blog]. 2020. [Consulta: 11 octubre 2023]. Disponible en: <https://ph.parker.com/us/es/product-list/hydrogen-generators-for-gc-gc-ms-fuel-and-carrier-gas-applications-99-99999-purity>
36. **ROSERO, Angela; et al.** "Impacto de la acreditación y la certificación de los laboratorios clínicos y el aseguramiento de la calidad". *Revista Científica Higía de la Salud* [en línea], 2023, (Ecuador), vol. 8 (1) , págs. 1–21. [Consulta: 15 febrero 2024]. ISSN 2773-7705. Disponible en: 10.37117/higia.v8i1.804
37. **ROYO, Miguel.** *Nutrición en Salud Pública.* Madrid-España: Instituto de Salud Carlos III, 2017, págs. 47-48.
38. **RTCA 67.04.54:10.** *Reglamento Técnico Centroamericano de Alimentos y Bebidas Procesadas: Aditivos Alimentarios.*
39. **SÁNCHEZ, Ana; et al.** "Sector aceites y grasas del Ecuador". *Universidad Técnica de Ambato* [en línea], 2019, (Ecuador), vol. 2 (1), págs. 1–4. [consulta: 10 septiembre 2023]. Disponible en: <https://obest.uta.edu.ec/wp-content/uploads/2020/10/Sector-aceites-y-grasas-de-origen-vegetal-y-animal-del-Ecuador-1.pdf>
40. **SGL.** *Guía de resolución problemas en sistemas GC* [Blog]. 2019. [Consulta: 25 febrero 2024]. Disponible en: <https://sglab.net/guia-de-resolucion-problemas-en-sistemas-gc/>
41. **SKOOG, Douglas; et al.** *Principios de Análisis Instrumental.* 6ª ed. México,D.F: Cengage Learning, 2008. ISBN 0-495-01201-7, págs. 788–810.
42. **SUPPORT MINITAB.** *Interpretar los resultados clave para Estudio de linealidad y sesgo del sistema de medición* [Blog]. 2020. [Consulta: 24 febrero 2024]. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/measurement-system-analysis/how-to/gage-study/gage-linearity-and-bias-study/interpret-the-results/key-results/>
43. **SYED, Asim.** *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats.*

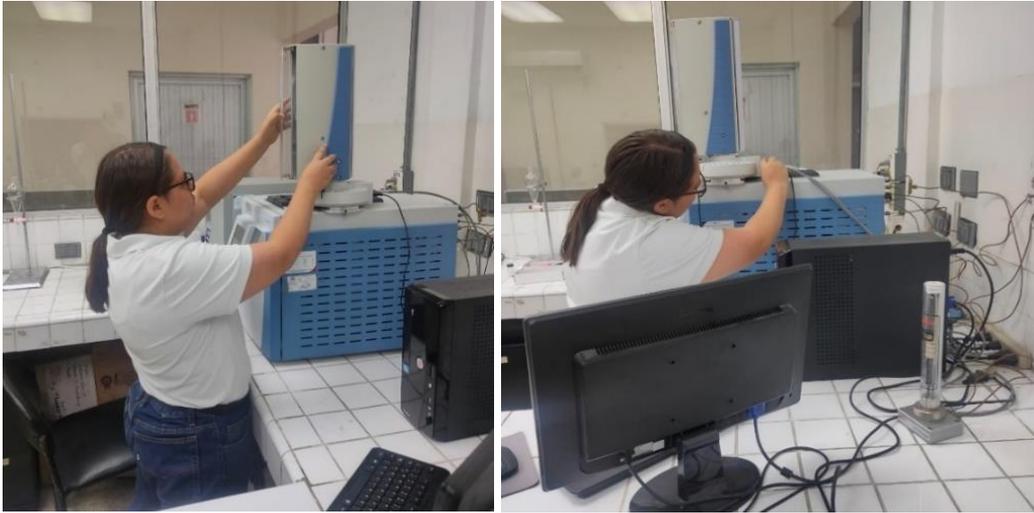
Indianapolis: Elsevier Inc, 2016. ISBN 9781630670566, págs. 187–207.

44. **THERMO SCIENTIFIC.** *Thermo Scientific AI-AS 1310: Liquid Sampling Automation.* [Blog]. 2013. [Consulta: 04 octubre 2023]. Disponible en: <https://cdn.osabana.com/innovatek/documentos/59.pdf>
45. **THERMOFISHER SCIENTIFIC.** *Ficha de datos de seguridad. Tert-Butylhydroquinone* [Blog]. 2023. [Consulta: 14 octubre 2023]. Disponible en: [https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h96/hc3/9673630253086/EN\\_ST-WB-MSDS-2601489-1-1-1.PDF](https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h96/hc3/9673630253086/EN_ST-WB-MSDS-2601489-1-1-1.PDF)
46. **UNODC.** *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos.* Nueva York: UNODC, 2010. ISBN 0875532357, págs. 5-15.
47. **URIBE, María; et al.** "Validación De Métodos Analíticos En Laboratorios De Ensayo De Aguas Residuales". *Kuxulkab'* [en línea], 2013, (México), vol. XIX (36) , pág. 14. [Consulta: 20 diciembre 2023]. ISSN 1665-0514. Disponible en: 10.19136/kuxulkab.a19n36.332.
48. **XU, Xiaoqing; et al.** "Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action". *Food Chemistry* [en línea], 2021, (China), vol. 353 (1), págs. 1–15. [Consulta: 10 enero 2024]. ISSN: 18737072. Disponible en: 10.1016/j.foodchem.2021.129488.

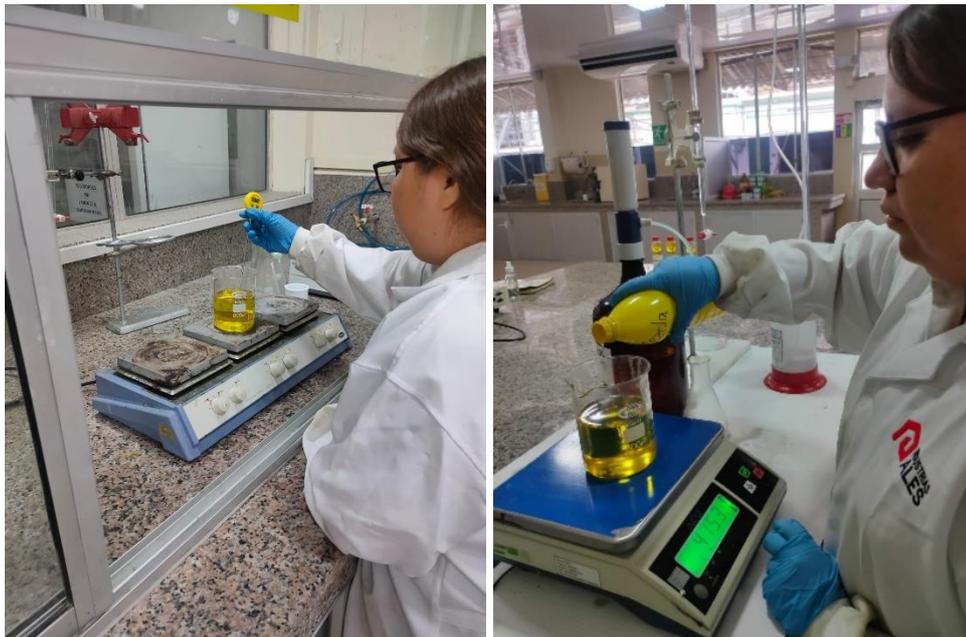
Total 48 referencias bibliográficas

## ANEXOS

### ANEXO A: RECONOCIMIENTO Y REUBICACIÓN DEL AUTOMUESTREADOR DEL CROMATÓGRAFO DE GASES



### ANEXO B: PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ACEITE Y MANTECA VEGETAL



### ANEXO C: ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ANTIOXIDANTE



**ANEXO D: TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ACEITE Y MANTECA VEGETAL**



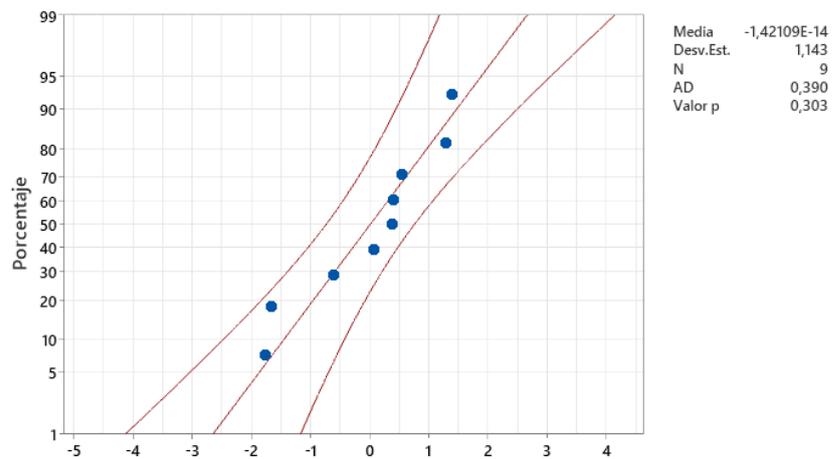
**ANEXO E: TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS POR ANALISTA DE INDUSTRIAS ALES**



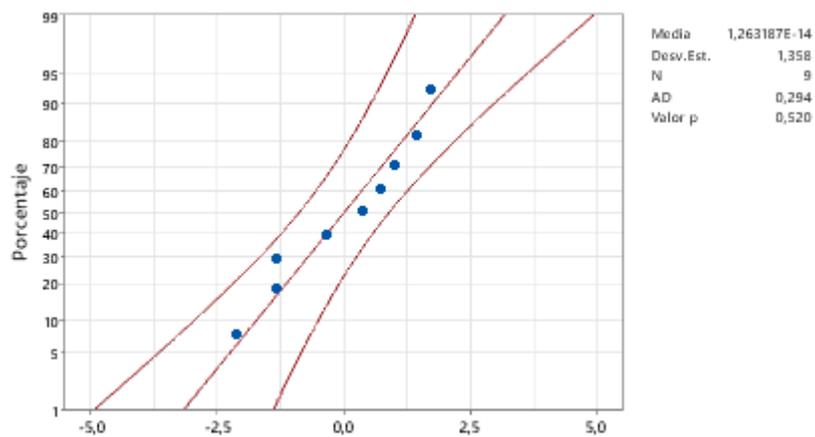
## ANEXO F: CUANTIFICACIÓN DEL ANTIOXIDANTE EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES



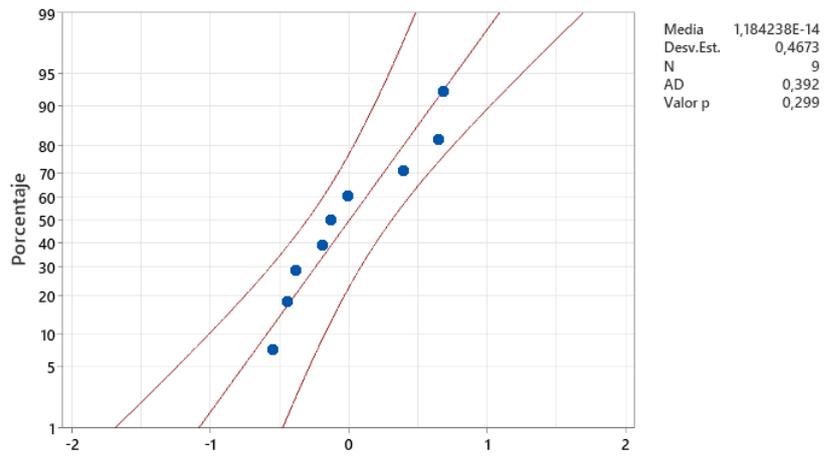
## ANEXO G: ESTUDIO DE NORMALIDAD PARA ANÁLISIS ANOVA EN ACEITE Y MANTECA VEGETAL



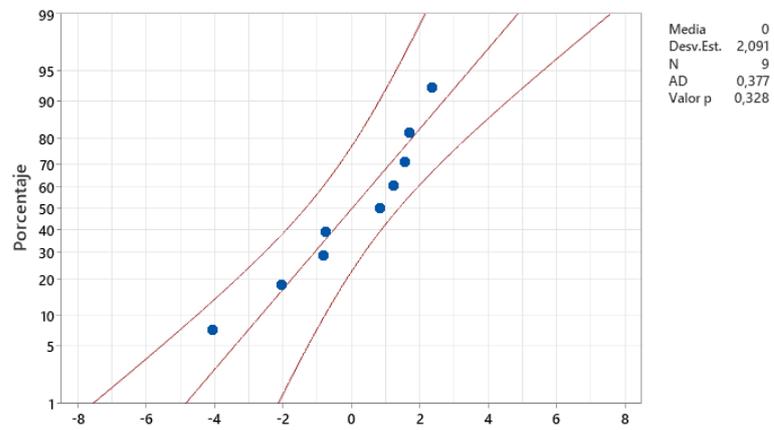
ANEXO G. Normalidad de 120 ppm en aceite vegetal



ANEXO G. Normalidad de 190 ppm en aceite vegetal

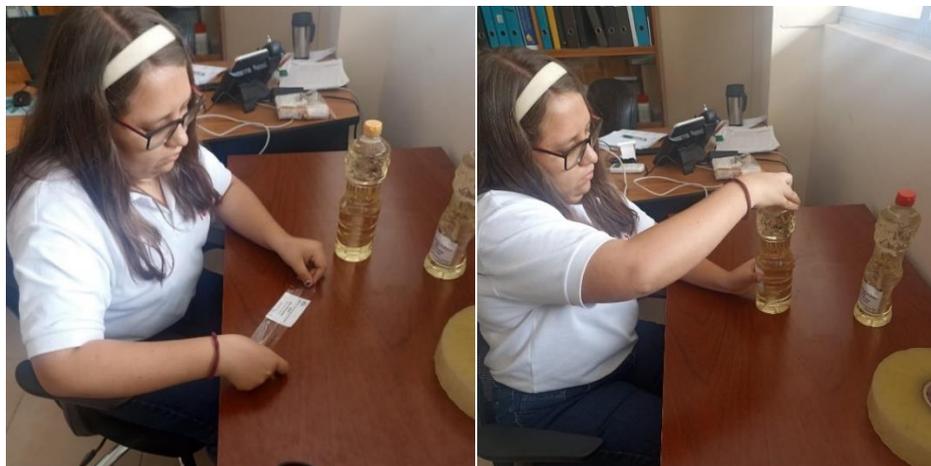


ANEXO G. Normalidad de 50 ppm en manteca vegetal



ANEXO G. Normalidad de 150 ppm en manteca vegetal

## ANEXO H: IDENTIFICACIÓN DE ESTÁNDARES PARA ENVÍO A LABORATORIO EXTERNO



# ANEXO I: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE TBHQ POR PARTE DE EUROFINS



Eurofins Central Analytical Laboratories

2219 Lakeshore Drive Suite 100  
New Orleans, Louisiana, USA 70122  
+1 504 297 3400  
ECALService@us4.eurofins-info.com

AGRORUM S.A

Operaciones Ecuador  
CDLA. KENNEDY VIEJA AV.  
SAN JORGE #205  
CALLE 2DA. OESTE  
GUAYAQUIL, GUAYAS, ECUADOR 00000

## ANALYTICAL REPORT

AR-24-QA-011457-01

Client Code: QA0005592

Received On: 25Jan2024  
Reported On: 06Feb2024

<b>Eurofins Sample Code:</b> 468-2024-01250339	<b>Sample Registration Date:</b> 25Jan2024
<b>Client Sample Code:</b> GYE-24/0246	<b>Condition Upon Receipt:</b> acceptable, 25°C
<b>Sample Description:</b> MUESTRA DE ACEITE; LOTE: PRUEBAA; F.MUESTREO: 15/01/2024	<b>Sample Reference:</b> INDUSTRIAS ALES C. A.
<b>QA914 - Tert-Butyl Hydroquinone (TBHQ) Reference</b>	<b>Completed</b>
AOCS Ce 6-86 (modified GC-MS)	06Feb2024

Parameter	Result
TBHQ (tert-butyl hydroquinone)	47 mg/kg

Respectfully Submitted,

Victoria Siegel  
ASM Eurofins Analytical Laboratories, Inc.

Eurofins Central Analytical Laboratories

2219 Lakeshore Drive Suite 100  
New Orleans, Louisiana, USA 70122  
+1 504 297 3400  
ECALService@us4.eurofins-info.com

AGRORUM S.A

Client Code: QA0005592

Operaciones Ecuador  
CDLA. KENNEDY VIEJAAV.  
SAN JORGE #205  
CALLE 2DA. OESTE  
GUAYAQUIL, GUAYAS, ECUADOR 00000

**ANALYTICAL REPORT**

AR-24-QA-011458-01

Received On: 25Jan2024  
Reported On: 06Feb2024

<b>Eurofins Sample Code:</b> 468-2024-01250340	<b>Sample Registration Date:</b> 25Jan2024
<b>Client Sample Code:</b> GYE-24/0247	<b>Condition Upon Receipt:</b> acceptable, 25°C
<b>Sample Description:</b> MUESTRA DE ACEITE; F.MUESTREO: 15/01/2024 00:00:00; LOTE: PRUEBA B	<b>Sample Reference:</b> INDUSTRIAS ALES C. A.
<b>QA914 - Tert-Butyl Hydroquinone (TBHQ) Reference</b> AOCS Ce 6-86 (modified GC-MS)	<b>Completed</b> 06Feb2024

Parameter	Result
TBHQ (tert-butyl hydroquinone)	120 mg/kg

Respectfully Submitted,

*Victoria Siegel*

Victoria Siegel  
ASM Eurofins Analytical Laboratories, Inc.

Eurofins Central Analytical Laboratories

2219 Lakeshore Drive Suite 100  
New Orleans, Louisiana, USA 70122  
+1 504 297 3400  
ECALService@us4.eurofins-info.com

AGRORUM S.A

Client Code: QA0005592

Operaciones Ecuador  
CDLA. KENNEDY VIEJAAV.  
SAN JORGE #205  
CALLE 2DA. OESTE  
GUAYAQUIL, GUAYAS, ECUADOR 00000

**ANALYTICAL REPORT**

AR-24-QA-011459-01

Received On: 25Jan2024  
Reported On: 06Feb2024

<b>Eurofins Sample Code:</b> 468-2024-01250341	<b>Sample Registration Date:</b> 25Jan2024
<b>Client Sample Code:</b> GYE-24/0248	<b>Condition Upon Receipt:</b> acceptable, 25°C
<b>Sample Description:</b> MUESTRA DE ACEITE; F.MUESTREO: 15/01/2024; LOTE: PRUBA C	<b>Sample Reference:</b> INDUSTRIAS ALES C. A.
<b>QA914 - Tert-Butyl Hydroquinone (TBHQ) Reference</b> AOCS Ce 6-86 (modified GC-MS)	<b>Completed</b> 06Feb2024

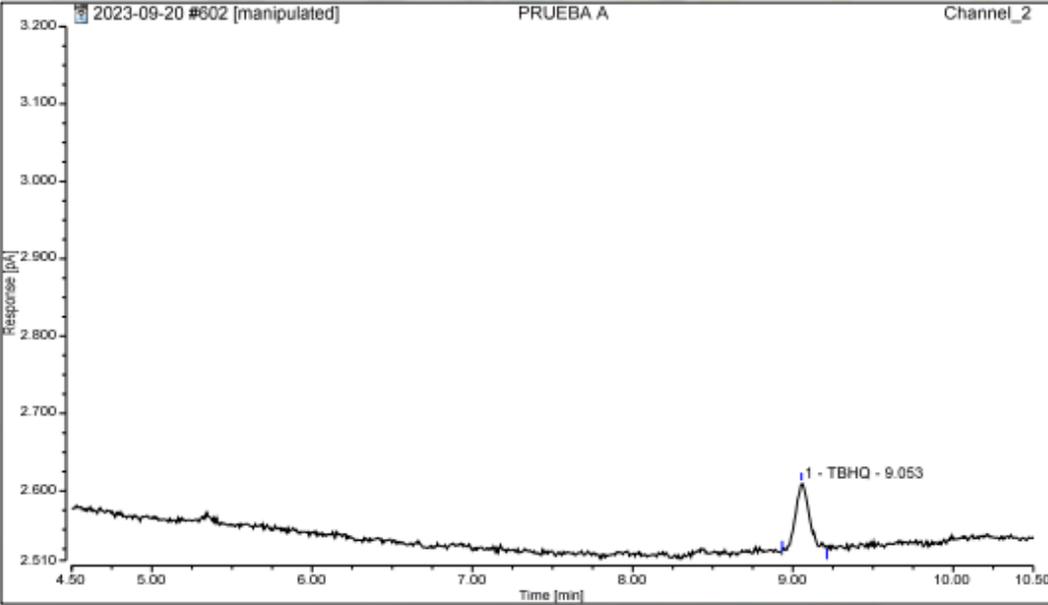
Parameter	Result
TBHQ (tert-butyl hydroquinone)	200 mg/kg

Respectfully Submitted,

*Victoria Siegel*

Victoria Siegel  
ASM Eurofins Analytical Laboratories, Inc.

**ANEXO J: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE TBHQ POR PARTE DE INDUSTRIAS ALES**

	<b>INDUSTRIAS ALES C.A.</b> DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD Informe de Ensayo N° 24-007	LABORATORIO INSTRUMENTAL II					
		Código: FPR 029 (a)					
		Vigente desde: Abril 2016					
		Edición N° 2					
<b>Chromatogram and Results</b>							
<b>Injection Details</b>							
Injection Name:	PRUEBA A	Run Time (min): 11.69					
Vial Number:	2	Injection Volume: 1.00					
Injection Type:	Unknown	Channel: Channel_2					
Instrument Method:	prueba1 200923	Bandwidth: n.a.					
Processing Method:	Antioxidante Dic. 2023	Dilution Factor: 1.0000					
Injection Date/Time:	16-feb-24 15:29	Sample Weight: 1.0000					
<b>Chromatogram</b>							
							
<b>Integration Results</b>							
No.	Peak Name	Retention Time	Area	Height	Relative Area	Relative Height	Amount
1	TBHQ	9.053	0.009	0.087	100.00	100.00	46.2940
Total:			0.009	0.087	100.00	100.00	
N° Solicitud:	24-007						
Cliente:	Validación						
Cantidad de muestra (g):	500						
Observaciones:	Muestra preparada para validación interlaboratorio						
Responsable:	 Johanna Bucay Martinez Pasante-Tesista						



# INDUSTRIAS ALES C.A.

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

LABORATORIO INSTRUMENTAL II

Código: FPR 029 (a)

Vigente desde: Abril 2016

Edición N° 2

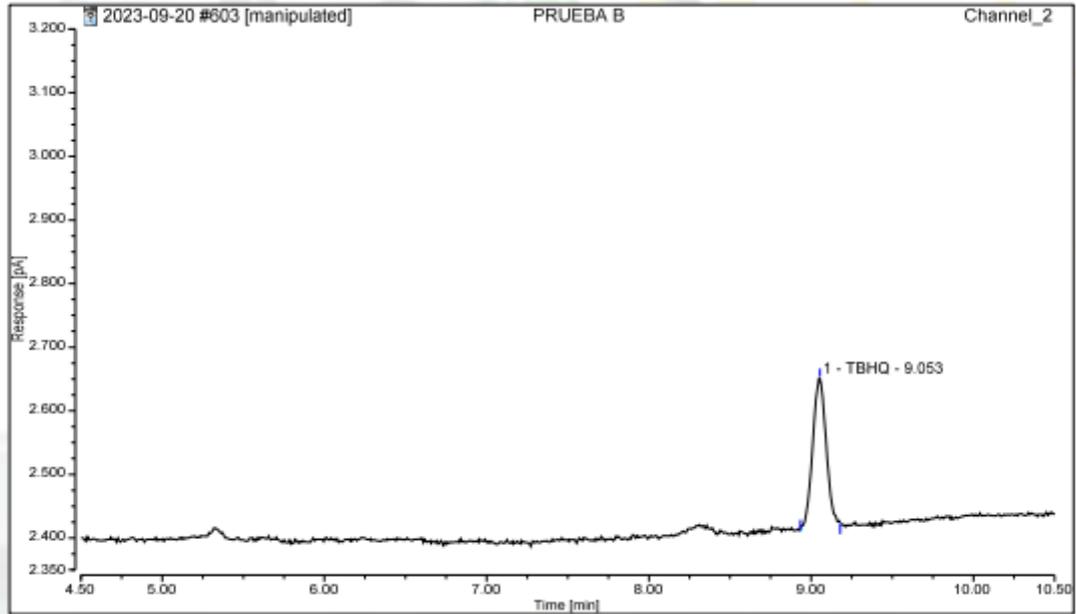
Informe de Ensayo N° 24-008

## Chromatogram and Results

### Injection Details

Injection Name:	PRUEBA B	Run Time (min):	11.69
Vial Number:	3	Injection Volume:	1.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	Channel_2
Instrument Method:	prueba1 200923	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	Antioxidante Dic. 2023	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	16-feb-24 15:44	Sample Weight:	1.0000

### Chromatogram



### Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area pA*min	Height pA	Relative Area %	Relative Height %	Amount ppm
1	TBHQ	9.053	0.022	0.233	100.00	100.00	120.0939
Total:			0.022	0.233	100.00	100.00	

N° Solicitud: 24-008  
Cliente: Validación  
Cantidad de muestra (g): 500  
Observaciones: Muestra preparada para validación interlaboratorio

Responsable:

Johanna Bucay Martinez  
Pasante-Tesista





**INDUSTRIAS ALES C.A.**  
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

LABORATORIO INSTRUMENTAL II  
Código: FPR 029 (a)  
Vigente desde: Abril 2016  
Edición N° 2

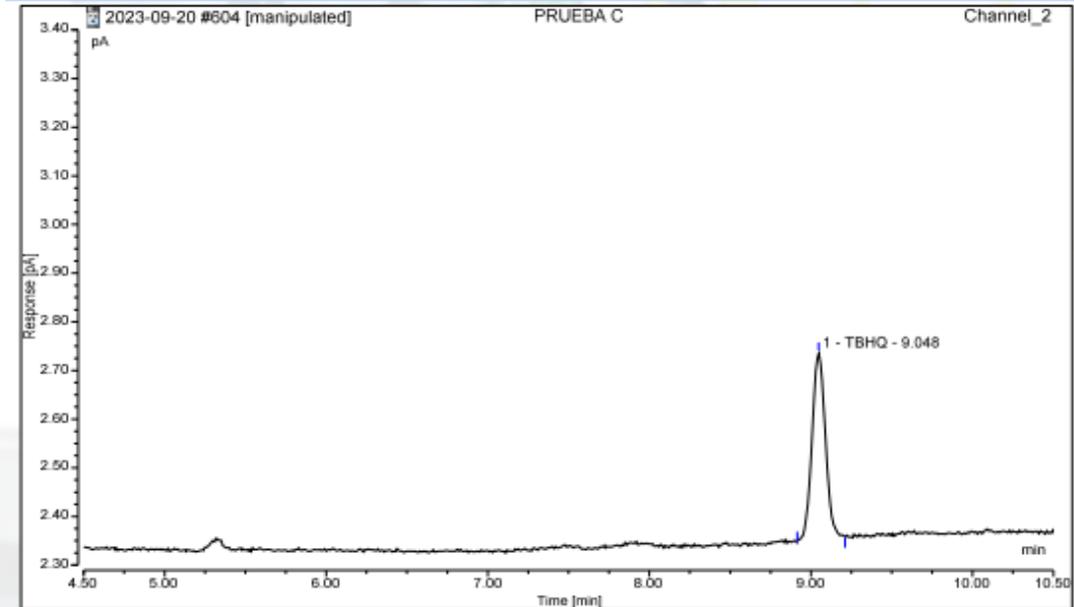
Informe de Ensayo N° 24-009

**Chromatogram and Results**

**Injection Details**

Injection Name:	PRUEBA C	Run Time (min):	11.69
Vial Number:	4	Injection Volume:	1.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	Channel_2
Instrument Method:	prueba1 200923	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	Antioxidante Dic. 2023	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	16-feb-24 16:07	Sample Weight:	1.0000

**Chromatogram**



**Integration Results**

No.	Peak Name	Retention Time min	Area pA*min	Height pA	Relative Area %	Relative Height %	Amount ppm
1	TBHQ	9.048	0.037	0.385	100.00	100.00	199.8674
Total:			0.037	0.385	100.00	100.00	

N° Solicitud: 24-009  
Cliente: Validación  
Cantidad de muestra (g): 500  
Observaciones: Muestra preparada para validación interlaboratorio

Responsable: Johanna Bucay Martinez  
Pasante-Tesista



**ANEXO K: NORMA INTERNA DEL MÉTODO VALIDADO IMPLEMENTADO EN INDUSTRIAS ALES**

	<b>MÉTODO DE ENSAYO - LABORATORIO DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTE EN ACEITES Y GRASAS POR CG CAPILAR</b>	<b>NORMA INTERNA</b>
		Código: ALES 00-61
Página 1 de 6	Edición N° 2	

**DETERMINACION DE ANTIOXIDANTE EN ACEITES Y GRASAS POR GC  
CAPILAR (TBHQ)**

**1. OBJETIVO:**

Desarrollar y validar un procedimiento para determinar cuantitativamente el antioxidante TBHQ en aceites y grasas por cromatografía de gases usando una columna capilar.

**2. ALCANCE:**

Esta norma interna aplica para la cuantificación de antioxidante TBHQ en aceites y grasas producidos en Industria Ales

**3. INTERFERENCIAS**

N/A

**4. DEFINICIONES:**

- **Cromatografía:** Método físico de separación en el que los componentes se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.
- **Antioxidante:** Compuestos químicos que interactúan con los radicales libres y los neutralizan cediendo uno o más de sus electrones oxidándose ellos mismos.
- **Oxidación:** Proceso químico en el que una molécula, átomo o ion pierde electrones.
- **Cromatografía de gases:** Técnica analítica utilizada para la separación y cuantificación de componentes químicos de una muestra vaporada, que son arrastrados por una fase gaseosa y se reparten por una fase estacionaria contenida en una columna cromatográfica hasta su detección por el detector seleccionado.
- **FID (Flame Ionization Detector):** Método estándar para medir la concentración de los hidrocarburos (% ácidos Grasos).
- **TBHQ (Terbutil-hidroquinona):** Sustancia química fenólica utilizado en algunos alimentos con el fin de extender la vida útil y prevenir la oxidación, sin alterar sabor, color o el valor nutricional.

**5. REACTIVOS - INSUMOS:**

- Helio (Gas Carrier) 99,95 mol%



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA**  
**NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO**

**Fecha de entrega:** 15/05/2024

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Johanna Carolina Bucay Martínez
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímica Farmacéutica
<p style="text-align: center;"> <b>Ing. Cristina Alejandra Muñoz Shugulí</b> <b>Director del Trabajo de Titulación</b></p> <p style="text-align: center;"> <b>BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basante</b> <b>Asesor del Trabajo de Titulación</b></p>